

PTO/PCT Rec'd 08 MAR 2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/52 C07K14/44 C12N9/02 C12N1/10 C07K16/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BERTRAM J ET AL: "ISOLATION OF A STEAROYL COENZYME DESATURASE FROM TETRAHYMENA-THERMOPHILA" JOURNAL OF PROTOZOOLOGY, vol. 28, no. 1, 1981, pages 127-131, XP002152567 ISSN: 0022-3921 abstract Ergebnisse</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 December 2000

Date of mailing of the international search report

12.02.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Herrmann, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08778

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOLL M ET AL: "THE EFFECT OF DIETARY STEROL ON THE ACTIVITY OF FATTY ACID DESATURASES ISOLATED FROM TETRAHYMENA-SETOSA" JOURNAL OF PROTOZOOLOGY, vol. 37, no. 3, 1990, pages 229-237, XP002152568 ISSN: 0022-3921 the whole document	11
X	--- FUJIWARA Y ET AL: "CYTOPLASMIC LOCATION OF LINOLEOYL-COENZYME DESATURASE IN MICROSOMAL MEMBRANES OF RAT LIVER" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 233, no. 2, 1984, pages 402-407, XP002152569 ISSN: 0003-9861 das ganze Dokument, speziell Seite 403, "Other methods"	11,13
X	--- NAPIER ET AL: "Identification of a Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase by heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, vol. 330, no. 2, March 1998 (1998-03), pages 611-614, XP002099453 ISSN: 0264-6021 figure 1	11
A		1-10, 12-16
X	& DATABASE GENBANK [Online] Accession No. AF031477, 2 May 1998 (1998-05-02) "Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase mRNA, complete cds"	11
A	the whole document	1-10, 12-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08778

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/52 C07K14/44 C12N9/02 C12N1/10 C07K16/20

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BERTRAM J ET AL: "ISOLATION OF A STEAROYL COENZYME DESATURASE FROM TETRAHYMENA-THERMOPHILA" JOURNAL OF PROTOZOOLOGY, Bd. 28, Nr. 1, 1981, Seiten 127-131, XP002152567 ISSN: 0022-3921 Zusammenfassung Ergebnisse --- -/--	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. Dezember 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

12.02.01

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrmann, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08778

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KOLL M ET AL: "THE EFFECT OF DIETARY STEROL ON THE ACTIVITY OF FATTY ACID DESATURASES ISOLATED FROM TETRAHYMENA-SETOSA" JOURNAL OF PROTOZOLOGY, Bd. 37, Nr. 3, 1990, Seiten 229-237, XP002152568 ISSN: 0022-3921 das ganze Dokument	11
X	--- FUJIWARA Y ET AL: "CYTOPLASMIC LOCATION OF LINOLEOYL-COENZYME DESATURASE IN MICROSOMAL MEMBRANES OF RAT LIVER" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, Bd. 233, Nr. 2, 1984, Seiten 402-407, XP002152569 ISSN: 0003-9861 das ganze Dokument, speziell Seite 403, "Other methods"	11,13
X	--- NAPIER ET AL: "Identification of a Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase by heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae" BIOCHEMICAL JOURNAL,GB,PORTLAND PRESS, LONDON, Bd. 330, Nr. 2, März 1998 (1998-03). Seiten 611-614, XP002099453 ISSN: 0264-6021 Abbildung 1	11
A		1-10, 12-16
X	& DATABASE GENBANK [Online] Accession No. AF031477, 2. Mai 1998 (1998-05-02) "Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase mRNA, complete cds"	11
A	das ganze Dokument	1-10, 12-16

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts AX99046W0	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 08778	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/09/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 10/09/1999
Anmelder AXIVA GMBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**NUCLEINSÄURE AUS TETRAHYMENA KODIEREND FUER EINE DELTA 6-DESATURASE, IHRE
HERSTELLUNG UND VERWENDUNG**

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 5

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCOMP 00/08778

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12N15/52 C07K14/44 C12N9/02 C12N1/10 C07K16/20		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N C07K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BERTRAM J ET AL: "ISOLATION OF A STEAROYL COENZYME DESATURASE FROM TETRAHYMENA-THERMOPHILA" JOURNAL OF PROTOZOLOGY, Bd. 28, Nr. 1, 1981, Seiten 127-131, XP002152567 ISSN: 0022-3921 Zusammenfassung Ergebnisse --- -/-	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<p>° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 15. Dezember 2000		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 12.02.01
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Herrmann, K



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KOLL M ET AL: "THE EFFECT OF DIETARY STEROL ON THE ACTIVITY OF FATTY ACID DESATURASES ISOLATED FROM TETRAHYMENA-SETOSA" JOURNAL OF PROTOZOOLOGY, Bd. 37, Nr. 3, 1990, Seiten 229-237, XP002152568 ISSN: 0022-3921 das ganze Dokument	11
X	--- FUJIWARA Y ET AL: "CYTOPLASMIC LOCATION OF LINOLEOYL-COENZYME DESATURASE IN MICROSOMAL MEMBRANES OF RAT LIVER" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, Bd. 233, Nr. 2, 1984, Seiten 402-407, XP002152569 ISSN: 0003-9861 das ganze Dokument, speziell Seite 403, "Other methods"	11,13
X	--- NAPIER ET AL: "Identification of a Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase by heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae" BIOCHEMICAL JOURNAL,GB,PORTLAND PRESS, LONDON, Bd. 330, Nr. 2, März 1998 (1998-03), Seiten 611-614, XP002099453 ISSN: 0264-6021	11
A	Abbildung 1	1-10, 12-16
X	& DATABASE GENBANK [Online] Accession No. AF031477, 2. Mai 1998 (1998-05-02) "Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase mRNA, complete cds"	11
A	das ganze Dokument	1-10, 12-16

VERTRAG ÜBER INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

10 DEC 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts AX99046WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/08778	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 08/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 10/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/52		
Anmelder CELANESE VENTURES GMBH		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 03/04/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 05.12.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Herrmann, K Tel. Nr. +49 89 2399 2670 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-38 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

15,16 ursprüngliche Fassung

1-14 eingegangen am 08/11/2001 mit Schreiben vom 06/11/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/10-10/10 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-8, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den

Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).
siehe Beiblatt

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Dokumente

Für diesen internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (IPER) werden die Dokumente des internationalen Recherchenbericht (ISR) vom 12.02.01 in der dort angegebenen Reihenfolge mit **D1-D5** abgekürzt. Der ISR ist von dieser Behörde erstellt worden.

Zu PUNKT I (Grundlage des Bescheids)

- 1 Die mit Schreiben vom 06.11.01 eingereichten, geänderten Ansprüche 2-10 und 12-14 erfüllen die Erfordernisse von Art. 34(2)(b) PCT.
- 2 Die mit Schreiben vom 06.11.01 eingereichten, geänderten Ansprüche 1 und 11 bringen Sachverhalte ein, die über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen und stehen damit im Widerspruch zu Art. 34(2)(b) PCT. Es handelt sich dabei um folgende Änderungen:

Der Ausdruck "mindestens 70% Sequenzhomologie" ist nicht in der Beschreibung enthalten (siehe S. 13, Z. 22: "Sequenzidentität") und macht auch keinen Sinn. Die Ansprüche wurden unter der Voraussetzung geprüft, daß die besagten Ansprüche das Merkmal "70% Sequenzidentität" enthalten.

- 3 Die ursprünglich eingereichte Anmeldung enthält 8 Seiten Sequenzprotokoll (19 Sequenzen).

Zu PUNKT V (Neuheit, erfinderische Tätigkeit, gewerbl. Anwendbarkeit)

1 Zusammenfassung der Anmeldung

Die vorliegende Anmeldung beschreibt im wesentlichen eine DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO:1 (cDNA) und SEQ ID NO:3 (genomische Sequenz) und die entsprechende abgeleitete Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2. Besagte Sequenzen stammen aus *Tetrahymena thermophila* und weisen Homologien zu delta-6-Desaturasen auf.

2 Neuheit (Art. 33(2) PCT)

- 2.1 Der Gegenstand von Ansprüchen 1-16 ist der Öffentlichkeit durch den zur Verfügung stehenden Stand der Technik nicht zugänglich gemacht worden und kann daher als neu betrachtet werden.

Im zur Verfügung stehenden Stand der Technik wird keine Nukleinsäure kodierend für eine delta-6-Desaturase aus *Tetrahymena thermophila* offenbart. **D1** offenbart die Isolierung eines delta-9-Desaturase-Proteins aus *Tetrahymena thermophila* und nicht einer delta-6-Desaturase aus *Tetrahymena thermophila*.

Im Stand der Technik ist ferner keine Nukleinsäure kodierend für eine delta-6-Desaturase mit mindestens 70% Sequenzidentität zu SEQ ID NO:2 offenbart. Das gleiche gilt für ein Polypeptid mit wenigstens 70% Sequenzidentität zu SEQ ID NO:2, und Teile davon mit mindestens 12 Aminosäuren.

3 Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)

- 3.1 Der Gegenstand der Ansprüche 1-16 ergibt sich nicht in naheliegender Weise aus dem zur Verfügung stehenden Stand der Technik und erfüllt daher die Erfordernisse von Art. 33(3) PCT.
- 3.2 Die kodierenden Sequenzen zahlreicher delta-6-Desaturasen sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. **D4** und **D5** (AF031477); siehe auch S. 26, Beispiel 3 und Abb. 4 dieser Anmeldung).
- 3.3 Die Isolierung der delta-6-Desaturasen aus *Tetrahymena thermophila* war jedoch, nach Auffassung der IPEA, ohne erfinderisches Zutun nicht möglich. Die delta-6-Desaturase von *Tetrahymena thermophila* besitzt z.B. keine Histidinboxen, wie sie bei einigen tierischen Desaturasen auftreten. Daher liegt nahe, daß besagte Desaturase z.B. mit degenerativen Primern, die von Histidinboxen abstammen, nicht zu klonieren ist. Desweiteren besteht laut vorliegender Beschreibung (S. 8, Z. 14-17) lediglich eine Identität von 25% zwischen der erfindungsgemäßen Polypeptidsequenz und bereits bekannten delta-6-Desaturasen.

4 Industrielle Verwertbarkeit (Art. 33(4) PCT)

Ansprüche 1-16 erfüllen die Anforderungen von Art. 33(4) PCT.

Zu PUNKT VIII (Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung)

Anspruch 15 verweist fälschlicherweise auf Anspruch 11 anstatt Anspruch 14.

Patentansprüche:

1. Nukleinsäure kodierend für delta-6-Desaturase aus *Tetrahymena* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.: 2 oder eine funktionelle Variante davon mit mindestens 70% Sequenzhomologie zu SEQ ID No.: 2, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ ID No.: 1 Teil des Anspruchs ist.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure aus einem Ciliaten erhalten wird.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure aus *Tetrahymena thermophila* erhalten wird.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, ist.
5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No.: 1 von Position 33 bis Position 1091 ist.
6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine oder mehrere nicht kodierende Sequenzen enthält.
7. Eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6 gemäß SEQ ID No.: 3 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ ID No.: 3 Teil des Anspruchs ist.

8. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 – 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor, enthalten ist.
9. Expressionvektoren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in funktioneller Kombination zu einem konstitutiven und / oder induzierbaren Promoter und optional einem Terminationssignal steht.
10. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.
11. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2 oder eine funktionelle Variante davon mit wenigstens 70% Sequenzhomologie zu SEQ ID No.: 2, und Teile davon mit mindestens 12 Aminosäuren.
12. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-7 in einem geeigneten Expressionssystem oder Wirtsorganismus exprimiert wird.
13. Spezifischer Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 11.
14. Transgener nicht-humaner Organismus enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

PATENT COOPERATION TREATY

PTO/PCT Rec'd 08 MAR 2002 PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or Agent's file reference AX99046WO	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/EP00/08778	International filing date (day/month/year) 08/09/2000	Priority date (day/month/year) 10/09/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/52		
Applicant CELANESE VENTURES GMBH		

1.	This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	<p>This REPORT consists of a total of 6 sheets including this title page.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of Administrative Instructions of the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of 2 sheets.</p>
3.	<p>This report contains indications relating to the following items:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 03/04/2001	Date of completion of this report 05.12.2001
Name and mailing address of the IPEA/ <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465 </div> </div>	Authorized officer: Herrmann, K Tel No +49 89 2399 2670 <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> </div>

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP00/08778

I. Basis of the report

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*

Description, pages:

1-38 as originally filed

Claims, No.:

15,16 as originally filed

1-14 received on 08/11/2001 with the letter of 06/11/2001

Drawings, sheets:

1/10-10/10 as originally filed

The sequence listing part of the description:

1-8, as originally filed

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets/fig:

5. ☐ This report has been written disregarding (some of) the amendments, which were considered as going beyond the description of the invention, as filed, as is indicated below (Rule 70.2(c)):

(All replacement sheets comprising amendments of this nature should be indicated in point 1 and attached to this report).
see separate sheet

6. Additional observations, if necessary:
see separate sheet

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-16
	No:	Claims	
Inventive Step (IS)	Yes:	Claims	1-16
	No:	Claims	
Industrial Applicability (IA)	Yes:	Claims	1-16
	No:	Claims	

2. Citations and explanations
see separate sheet

VIII. Certain observations in the international application

The following observations on the clarity of the claims, descriptions, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:
see separate sheet



Documents

For this international preliminary examination report (IPER), the documents in the international research report (ISR) dated 12.02.01 are abbreviated, in the sequence given in the report, to **D1-D5**. The ISR was prepared by this authority.

With regard to ITEM I (Basis of the notification)

- 1 The amended claims 2-10 and 12-14 which were submitted together with the letter dated 06.11.01 fulfill the requirements of Art. 34(2)(b) PCT.
2. The amended claims 1 and 11 which were submitted together with the letter dated 06.11.01 introduce facts which go beyond the disclosure content of the international application at the time of the application and are consequently in conflict with Art. 34(2)(b) PCT. This relates to the following amendments:

The expression "at least 70% sequence homology" is not contained in the description (see p.13, l. 22: "sequence identity") and also does not make sense. The claims were examined on the assumption that said claims contain the feature "70% sequence identity".

3. The originally filed application contains 8 pages of sequence listing (19 sequences).

With regard to ITEM V (Novelty, inventive step, industrial applicability)

1 Summary of the application

The present application essentially describes a DNA sequence as depicted in SEQ ID No.:1 (cDNA) and SEQ ID No.:3 (genomic sequence) and the corresponding, deduced

amino acid sequence as depicted in SEQ ID No.:2. Said sequences are derived from *Tetrahymena thermophila* and exhibit homologies with delta-6-desaturases.

2 Novelty (Art. 33(2) PCT)

- 2.1 The subject matter of claims 1-16 has not been made accessible to the public by the available prior art and can therefore be regarded as being novel.

The available prior art does not disclose any nucleic acid encoding a *Tetrahymena thermophila* delta-6-desaturase. D1 discloses the isolation of a *Tetrahymena thermophila* delta-9-desaturase protein and not of a *Tetrahymena thermophila* delta-6-desaturase.

Furthermore, the prior art does not disclose any nucleic acid encoding a delta-6-desaturase having at least 70% sequence identity with SEQ ID No.:2. The same applies to a polypeptide having at least 70% sequence identity with SEQ ID No.:2, and parts thereof containing at least 12 amino acids.

3 Inventive step (Art. 33(3) PCT)

- 3.1 The subject matter of claims 1-16 does not ensue in an obvious manner from the available prior art and therefore fulfills the requirements of Art. 33(3) PCT.

- 3.2 The coding sequences for numerous delta-6-desaturases are known to the skilled person (see, for example, D4 and D5 (AF031477); see also p. 26, Example 3 and Fig. 4 of this application).

- 3.3 However, in the opinion of the IPEA, it was not possible to isolate the *Tetrahymena thermophila* delta-6-desaturases without inventive input. The *Tetrahymena thermophila* delta-6-desaturase does not, for example,



possess any histidine boxes as occur in the case of some animal desaturases. It is therefore obvious that said desaturase cannot, for example, be cloned using degenerate primers which are derived from histidine boxes. Furthermore, according to the present description (p. 8, 1. 14-17), there is only an identity of 25% between the polypeptide sequence according to the invention and previously known delta-6-desaturases.

4 Industrial applicability (Art. 33(4) PCT)

Claims 1-16 fulfill the requirements of Art. 33(4) PCT.

With regard to ITEM VIII (Specific comments with regard to the international application)

Claim 15 refers mistakenly to claim 11 instead of claim 14.

2

Patent Claims:

1. A nucleic acid encoding *Tetrahymena* delta-6-desaturase having an amino acid sequence as depicted in SEQ ID No.: 2, or a functional variant thereof having at least 70% sequence identity with SEQ ID No.: 2, and parts thereof containing at least 8 nucleotides, with SEQ ID No.: 1 being part of the claim.
2. A nucleic acid as claimed in claim 1. which is obtained from a ciliate.
3. A nucleic acid as claimed in claim 1 or 2, which is obtained from *Tetrahymena thermophila*.
4. A nucleic acid as claimed in claims 1-3, which is a DNA or RNA, preferably a double-stranded DNA.
5. A nucleic acid as claimed in one of claims 1 to 4, which is a DNA having a nucleic acid sequence as depicted in SEQ ID No.: 1 from position 33 to position 1091.
6. A nucleic acid as claimed in one of claims 1 to 5, which contains one or more noncoding sequences.
7. An isolated nucleic acid as claimed in one of claims 1 to 6 as depicted in SEQ ID No.: 3, or a functional variant thereof, and parts thereof containing at least 8 nucleotides, with SEQ ID No.: 3 being part of the claim.
8. A nucleic acid as claimed in one of claims 1 - 7, which is contained in a vector, preferably in an expression vector.

9. An expression vector as claimed in claim 8, wherein the nucleic acid is functionally combined with a constitutive and/or inducible promoter and optionally with a termination signal.
- 5
10. A process for preparing a nucleic acid as claimed in one of claims 1-7, which comprises synthesizing the nucleic acid chemically or isolating it from a gene library using a probe.
- 10
11. A polypeptide having an amino acid sequence as depicted in SEQ ID No.: 2, or a functional variant thereof having at least 70% sequence homology with SEQ ID No.: 2, and parts thereof containing at least 12 amino acids.
- 15
12. A process for preparing a polypeptide as claimed in claim 11, which comprises expressing a nucleic acid as claimed in one of claims 1-7 in a suitable expression system or host organism.
- 20
13. A specific antibody which is directed against a polypeptide as claimed in claim 11.
- 25
14. A transgenic, nonhuman organism which harbors a nucleic acid as claimed in one of claims 1 to 10.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An

LUDERSCHMIDT MAI, OPPERMANN SCHÜLER & PARTNER
RUPPRECHT GREIBER
 z.H. SCHÜLER, Helga.
 John-F.-Kennedy-Strasse 4
 D-65189 Wiesbaden
 GERMANY

PTO/PCT Rec'd 08 MAR 2002

TEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

Eing.: 16. Feb. 2001

Frist:

12.04.01

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

12/02/2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

AX99046WO

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/ 08778

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

08/09/2000

Anmelder

AXIVA GMBH

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsbüro dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90.3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsbüro vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswählerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL-2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Heike Zoglauer

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsvorschriften zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsvorschriften.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsvorschriften, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

LUDERSCHMIDT, Wolfgang
John-F.-Kennedy-Strasse 4
D-65189 Wiesbaden
ALLEMAGNE

Luderschmidt, Schüler & Partner
PATENTANWÄLTE

Eing. 27. Aug. 2001

Frist: 24. 10. 01

WU 24.09.01

08 MAR 2002

PCT

SCHRIFTLICHER BESCHEID
(Regel 66 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr) 24.08.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
AX99046WO

ANTWORT FÄLLIG innerhalb von **2 Monat(en) und
15 Tagen** ab obigem Absendedatum

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP00/08778

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
08/09/2000

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
10/09/1999

Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK
C12N15/52

Anmelder

CELANESE VENTURES GMBH

- Dieser Bescheid ist der erste schriftliche Bescheid der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde
- Dieser Bescheid enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- | | | |
|------|-------------------------------------|---|
| I | <input checked="" type="checkbox"/> | Grundlage des Bescheides |
| II | <input type="checkbox"/> | Priorität |
| III | <input type="checkbox"/> | Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit |
| IV | <input type="checkbox"/> | Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung |
| V | <input checked="" type="checkbox"/> | Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung |
| VI | <input type="checkbox"/> | Bestimmte angeführte Unterlagen |
| VII | <input type="checkbox"/> | Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung |
| VIII | <input checked="" type="checkbox"/> | Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung |

- Der Anmelder wird **aufgefordert**, zu diesem Bescheid **Stellung zu nehmen**

Wann? Siehe oben genannte Frist. Der Anmelder kann vor Ablauf dieser Frist bei der Behörde eine Verlängerung beantragen, siehe Regel 66.2 d).

Wie? Durch Einreichung einer schriftlichen Stellungnahme und gegebenenfalls von Änderungen nach Regel 66.3. Zu Form und Sprache der Änderungen, siehe Regeln 66.8 und 66.9.

Dazu: Hinsichtlich einer zusätzlichen Möglichkeit zur Einreichung von Änderungen, siehe Regel 66.4. Hinsichtlich der Verpflichtung des Prüfers, Änderungen und/oder Gegenvorstellungen zu berücksichtigen, siehe Regel 66.4 bis. Hinsichtlich einer formlosen Erörterung mit dem Prüfer, siehe Regel 66.6.

Wird keine Stellungnahme eingereicht, so wird der internationale vorläufige Prüfungsbericht auf der Grundlage dieses Bescheides erstellt.

- Der Tag, an dem der internationale vorläufige Prüfungsbericht gemäß Regel 69.2 spätestens erstellt sein muß, ist der: 10/01/2002.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragte Behörde:

 Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter / Prüfer

Herrmann, K

Formalsachbearbeiter (einschl. Fristverlängerung)

Hingel, W

Tel. +49 89 2399 8717



I. Grundlage des Bescheids

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Bescheids als "ursprünglich eingereicht"*):

Beschreibung, Seiten:

1-38 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/10-10/10 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1-8, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung			
Neuheit (N)	Ansprüche	11, 13	
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ansprüche	1-16	
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ansprüche		

2. Unterlagen und Erklärungen:
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Dokumente

Für diesen schriftlichen Bescheid werden die Dokumente des internationalen Recherchenbericht (ISR) vom 12.02.01 in der dort angegebenen Reihenfolge mit **D1-D5** abgekürzt. Der ISR ist von dieser Behörde erstellt worden.

Zu PUNKT I (Grundlage des Bescheids)

Die ursprünglich eingereichte Anmeldung enthält 8 Seiten Sequenzprotokoll (19 Sequenzen).

Zu PUNKT V (Neuheit, erfinderische Tätigkeit, gewerbl. Anwendbarkeit)

1 Zusammenfassung der Anmeldung

Die vorliegende Anmeldung beschreibt im wesentlichen eine DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO:1 (cDNA) und SEQ ID NO:3 (genomische Sequenz) und die entsprechende abgeleitete Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:2. Besagte Sequenzen stammen aus *Tetrahymena thermophila* und weisen Homologien zu delta-6-Desaturasen auf.

2 Neuheit (Art. 33(2) PCT)

2.1 Der Gegenstand der Ansprüche 11 und 13 erfüllt nicht die Anforderungen von Art. 33(2) und 33(3) PCT.

2.2 **D1** offenbart die Isolierung einer delta-6-Desaturase aus *Tetrahymena thermophila*. Die IPEA ist der Auffassung, dass es sich bei dem Protein in **D1** um das Protein gemäss SEQ ID NO:2 der vorliegenden Anmeldung handelt. Der Gegenstand von Anspruch 11 ist somit nicht neu gegenüber **D1** (Art. 33(2) und (3) PCT).

Unter den Begriff "funktionelle Variante" fällt jedes Polypeptid (Anspruch 11), welches delta-6-Desaturase-Aktivität aufweist. Auf Grund der getroffenen Wortwahl ("funktionelle Variante") ist der Gegenstand von Anspruch 11 nicht neu

z.B. gegenüber **D2**, **D5** (AF031477) und **D3**. Besagter Anspruch ist nicht auf eine delta-6-Desaturase bzw. eine delta-6-Desaturase-Variante aus *Tetrahymena* beschränkt. Ausserdem ist aus Abb. 4 dieser Anmeldung ersichtlich, dass bekannte Desaturasen in einem Bereich von "mindestens 6 Aminosäuren" mit der Sequenz in SEQ ID NO:2 identisch sind.

- 2.3 Antikörper gegen delta-6-Desaturasen sind bekannt (siehe z.B. **D3**). Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten zwischen delta-6-Desaturasen ist diese Behörde der Meinung, dass z.B. die Antikörper von **D3** ebenfalls an eine delta-6-Desaturase aus *Tetrahymena* binden. Anspruch 13 bezieht sich nicht auf Antikörper, welche "spezifisch" die Polypeptide gemäss Anspruch 11 binden; der Gegenstand des Anspruchs ist somit nicht neu im Sinne von Art. 33(2) PCT.

3 Erfinderische Tätigkeit (Art. 33(3) PCT)

- 3.1 Der Gegenstand der Ansprüche 1-10, 12 und 14-16 erfüllt nicht die Anforderungen von Art. 33(3) PCT.
- 3.2 Die kodierenden Sequenzen zahlreicher delta-6-Desaturasen sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. **D4** und **D5** (AF031477); siehe auch S. 26, Beispiel 3 und Abb. 4 dieser Anmeldung).
- 3.3 Der nächstliegende Stand der Technik wird jedoch in **D1** gesehen. **D1** beschreibt die Isolierung einer delta-6-Desaturase aus *Tetrahymena thermophila*. Diese Behörde ist der Meinung, dass der Fachmann, ohne erfinderisches Zutun, die DNA kodierend für das Proteins aus **D1** erhalten würde. Dabei handelt es sich um eine Nukleinsäure kodierend für eine delta-6-Desaturase aus *Tetrahymena thermophila*. Der Gegenstand der Ansprüche 1-10 und 12 ist somit nicht erfinderisch im Sinne von Art. 33(3) PCT.
- 3.4 Aufgrund der direkten oder indirekten Abhängigkeit der Ansprüche 14-16 von Ansprüchen 1-10 können besagte Ansprüche nur dann unter Art. 33(3) PCT anerkannt werden, wenn sie sich auf einen Anspruch beziehen, der als neu und erfinderisch betrachtet werden kann.

4 Industrielle Verwertbarkeit (Art. 33(4) PCT)

Ansprüche 1-16 erfüllen die Anforderungen von Art. 33(4) PCT.

Zu PUNKT VIII (Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung)

Anspruch 14 umfasst auch transgene Menschen. Dieser Gegenstand verstösst gegen die guten Sitten in bestimmten PCT-Mitgliedsstaaten, z.B. Art. 53(a) des EPÜ.

Die Nukleinsäuren gemäss Anspruch 1 kodieren für eine delta-6-Desaturase und stammen alle aus Tetrahymena. Daher ist Anspruch 2 ("aus einem Ciliaten") überflüssig.

Sollte der Anmelder neue Ansprüche einreichen, wird er gebeten, die durchgeführten Änderungen deutlich aufzuzeigen und anzugeben, auf welche Stellen in der ursprünglich eingereichten Anmeldung sich diese Änderungen stützen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß die Anmeldung nicht in der Weise abgeändert werden darf, daß ihr Gegenstand über den Inhalt der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgeht (Art. 34(2)(b) PCT).



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

LUDERSCHMIDT, Wolfgang
John-F.-Kennedy-Strasse 4
D-65189 Wiesbaden
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 23 October 2000 (23.10.00)	
Applicant's or agent's file reference AX99046WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/EP00/08778	International filing date (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 10 September 1999 (10.09.99)
Applicant AXIVA GMBH et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
10 Sept 1999 (10.09.99)	199 43 270.8	DE	03 Octo 2000 (03.10.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Peggy Steunenberg Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	--

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

PCT/EP 00 / 08778

Internationales Aktenzeichen

(08.09.00)

Internationales Anmeldedatum

08 SEP 2000

EUROPEAN PATENT OFFICE
PCT INTERNATIONAL APPLICATION
Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) AX99046WO

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Neue Nukleinsäure aus Tetrahymena kodierend für eine delta 6-Desaturase, ihre Herstellung und Verwendung

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

AXIVA GMBH
Industriepark Hoechst
65926 Frankfurt am Main
DE

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

RÜSING, Matthias
Lindenthalgürtel 75
50935 Köln
DE

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒ Anwalt

☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

LUDERSCHMIDT, Wolfgang; MAI, Peter; OPPERMANN, Frank;
SCHÜLER, Helga; RUPPRECHT, Klaus; GREIBER, K. Dieter
John-F.-Kennedy-Strasse 4
65189 Wiesbaden /DE

Telefonnr.:
0611/77844-0

Telefaxnr.:
0611/77844-77

Fernschreibnr.:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

KIY, Thomas
Loreleystrasse 9
65929 Frankfurt am Main
DE[▲]

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

DOMINITZKI, Annette
Hechtersheimer Berg 25
55270 Klein-Winternheim
DE[▲]

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):
DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):
DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☐ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familiennamen, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☐ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG DER STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☒ **AP** ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, MZ Mosambik, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, TZ Vereinigte Republik Tansania, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ **EA** Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP** Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **OA** OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE Vereinigte Arabische Emirate | <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AG Antigua und Barbuda | <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich | <input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan | <input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input checked="" type="checkbox"/> MA Marokko |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input checked="" type="checkbox"/> BZ Belize | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> MZ Mosambik |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Deutschland | <input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input checked="" type="checkbox"/> DM Dominica | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> DZ Algerien | <input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Kroatien | <input checked="" type="checkbox"/> TZ Vereinigte Republik Tansania |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN Indien | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Island | <input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia | <input checked="" type="checkbox"/> ZA Südafrika |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:



Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung (einschließlich der Gebühren) muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		ationale Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung:* regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 10 SEP 1999 (10.09.1999)	199 43 270.8	DE		
Zeile (2)				
Zeile (3)				

☐ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA)
(falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchen-
behörden für die Ausführung der internationalen Recherche
zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an;
der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden):

Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese
frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde
beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist):

ISA / EPA

Datum (Tag/Monat/Jahr)

Aktenzeichen

Staat (oder regionales Amt)

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

Diese internationale Anmeldung enthält
die folgende Anzahl von Blättern:

Antrag : 4
Beschreibung (ohne
Sequenzprotokollteil) : 38
Ansprüche : 3
Zusammenfassung : 1
Zeichnungen : 10
Sequenzprotokollteil
der Beschreibung : 8
Blattzahl insgesamt : 64

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☐ Blatt für die Gebührenberechnung
2. ☐ Gesonderte unterzeichnete Vollmacht
3. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden):
4. ☐ Begründung für das Fehlen einer Unterschrift
5. ☒ Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch
folgende Zeilennummer gekennzeichnet:
6. ☐ Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:
7. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material
8. ☐ Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form
9. ☒ Sonstige (einzeln auflisten): Diskette mit Sequenzprotokoll

Abbildung der Zeichnungen, die
mit der Zusammenfassung
veröffentlicht werden soll (Nr.): 5

Sprache, in der die
internationale Anmeldung Deutsch
eingereicht wird:

Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig
aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.


Dr. Luderschmidt
Patentanwalt (Zus. Nr. 141)

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung: 08 SEP 2000 (- 8. 09. 2000)		2. Zeichnungen <input checked="" type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:		
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:		
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben	

Vom Internationalen Büro auszufüllen	
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:	

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference AX99046WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/08778	International filing date (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00)	Priority date (day/month/year) 10 September 1999 (10.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/52		
Applicant CELANESE VENTURES GMBH		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 03 April 2001 (03.04.01)	Date of completion of this report 05 December 2001 (05.12.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP00/08778

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-38, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages 15,16, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 1-14, filed with the letter of 06 November 2001 (06.11.2001)
- ☒ the drawings:
pages 1/10-10/10, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1-8, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Continuation of: Boxes I.5. and I.6.

- 1 The amended Claims 2-10 and 12-14 filed with the letter of 6 November 2001 meet the requirements of PCT Article 34(2)(b).

- 2 The amended Claims 1 and 11 filed with the letter of 6 November 2001 introduce substantive matter which goes beyond the disclosure in the international application as filed and therefore contravenes PCT Article 34(2)(b). This finding concerns the following amendments:

The phrase "at least 70% sequence homology" is not contained in the description (see page 13, line 22: "sequence identity") and also makes no sense. The claims were examined on the assumption that said claims contained the feature "70% sequence identity".

- 3 The originally filed application contains 8 pages of sequence protocols (19 sequences).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 00/08778

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Documents

This international preliminary examination report (IPER) refers to the documents cited in the international search report (ISR) of 12 February 2001 in the sequence in which they are listed therein as **D1-D5**. The ISR was drafted by this authority.

1 Summary of the application

The present application essentially describes a DNA sequence as per SEQ ID NO: 1 (cDNA) and SEQ ID NO: 3 (genomic sequence) and the corresponding derived amino acid sequence as per SEQ ID NO: 2. Said sequences stem from *Tetrahymena thermophila* and have homologues to delta-6-desaturases.

2 Novelty (PCT Article 33(2))

2.1 The subjects of Claims 1-16 are not shown by the available prior art and can therefore be considered novel.

The available prior art does not disclose a nucleic acid coding for a delta-6-desaturase from *Tetrahymena thermophila*. **D1** discloses the isolation of a delta-9-desaturase protein from *Tetrahymena thermophila* and not a delta-6-desaturase from *Tetrahymena thermophila*.

Furthermore, the prior art does not disclose a nucleic acid coding for a delta-6-desaturase with at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 2. The same applies to a polypeptide with at least 70% sequence identity to SEQ ID NO: 2 and parts thereof with at least 12 amino acids.

3 Inventive step (PCT Article 33(3))

3.1 The subjects of Claims 1-16 are not obvious from the available prior art and therefore meet the requirements of PCT Article 33(3).

3.2 The coding sequences of numerous delta-6-desaturases are known to a person skilled in the art (see, for example **D4** and **D5** (AF031477); see also page 26, Example 3 and Figure 4 of the present application).

3.3 It is the opinion of the IPEA, however, that it was not possible to isolate delta-6-desaturases from *Tetrahymena thermophila* without exercising inventive step. The delta-6-desaturase from *Tetrahymena thermophila* has, for example, no histidine boxes, which occur in some animal desaturases. It is therefore obvious that said desaturase cannot be cloned for example with degenerative primers, which stem from histidine boxes. Furthermore, according to the present description (page 8, lines 14-17),

there is only 25% identity between the polypeptide sequence as per the invention and already known delta-6-desaturases.

4 **Industrial applicability (PCT Article 33(4))**

Claims 1-16 meet the requirements of PCT Article 33(4).

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

Claim 15 refers incorrectly to Claim 11 instead of
Claim 14.

Luderschmidt, Schüler & Partner

PATENTANWÄLTE

PATENT COOPERATION TREATY

eing. 29. Mai 2001

Frist

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

08 MAR 2002

LUDERSCHMIDT, Wolfgang
Kanzlei Luderschmidt & Partner
John-F.-Kennedy-Strasse 4
65189 Wiesbaden
ALLEMAGNE

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 16 May 2001 (16.05.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference AX99046WO	
International application No. PCT/EP00/08778	International filing date (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

AXIVA GMBH
Industriepark Hoechst
65926 Frankfurt am Main
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

CELANESE VENTURES GMBH
Industriepark Hoechst
65926 Frankfurt am Main
Germany

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Peggy Steunenbergh

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Letter, dated November 6, 2001, from Luderschmidt, Schüler & Partners, Wiesbaden, to the European Patent Office, Munich

CELANESE VENTURES GMBH

International Patent Application PCT/EP00/08778

Tetrahymena nucleic acid encoding a delta-6-desaturase,
its preparation and use

In response to the notification dated August 27, 2001:

I.

We are herewith forwarding in triplicate the new pages 39 and 40 containing the new claims 1, 11, 13 and 14.

Claim 1 was amended such that the subject matter now only encompasses nucleic acids which encode functional variants of the polypeptide having more than 70% sequence homology with SEQ ID No. 2. This definition of the "functional variant" corresponds to the definition in lines 24 to 28 on page 13 of the description and does not therefore infringe the regulations of Art. 34 PCT.

In an analogous manner, claim 11 was amended such that the subject matter now only encompasses functional variants of the polypeptide having more than 70% sequence homology with SEQ ID No. 2. Furthermore, it is now only parts of the polypeptide according to the invention which comprise at least 12 amino acids which are claimed. This amendment is based on lines 5 to 11 on page 13 and does not infringe Art. 34 PCT, either.

The subject matter of claim 13 was restricted to antibodies which specifically bind the polypeptide as claimed in claim 11. This amendment is based on line 21 on page 15 of the present application.

The subject matter of claim 14 was restricted to "nonhuman" organisms.

In addition, we are herewith forwarding pages 10, 54, 61-65 and 75 and 76 from "Studies on heterologous protein expression and on *Metabolic Engineering* in *Tetrahymena thermophila*", U. Flachenäcker, April 1999, Degree dissertation at the Technical University Berlin, School of Food Science and Biotechnology. Relevant passages are emphasized.

II.

Under item 2.2., the Examining Division takes the view that the subject matter of claim 11 (*Tetrahymena* delta-6-desaturase) is not novel since it was disclosed in D1. We respectfully inform you that the applicant is unable to follow this argument. D1 describes a stearyl desaturase. This is a delta-9-desaturase; i.e. an enzyme which catalyzes a completely different reaction. D1 does not describe any delta-6-desaturase activity.

The Examining Division is furthermore of the opinion that any polypeptide possessing delta-6-desaturase activity comes within the term "functional variant" and that such polypeptides have already been described (D2, D3 and D5), and that the subject matter of claim 11 is not novel for this reason as well. However, the new claim 11 only encompasses functional variants of the polypeptide which possess more than 70% sequence homology with SEQ ID No. 2. Known delta-6-desaturases exhibit a homology of at most 38% with the polypeptide sequence according to the invention (see figures 3a-e). Furthermore, we are altering claim 11 in accordance with lines 5 to 8 on page 13 of the description such that parts of the sequence containing at least 12 amino acids are claimed, in order to remove random overlapping with the sequence for the borage delta-6-desaturase from the scope of claim 11.

Under item 2.3., the Examining Division states that, because of the sequence similarities between delta-6-desaturases, the antibodies which D3 describes could also bind to a *Tetrahymena* delta-6-desaturase. In this case, too, we should refer to the astonishing difference in the *Tetrahymena* delta-6-desaturase as compared with other delta-6-desaturases. With the polypeptide sequence according to the invention having an identity of at most 25% with other delta-6-desaturases (see lines 16-19 on page 8 of the description), such a cross reactivity is not readily to be expected under the circumstances; it is, on the contrary, very improbable. Furthermore, by its dependence on claim 11, and by limiting its subject matter to antibodies which specifically bind a polypeptide as claimed in claim 11, the new claim 13 is restricted such that the antibody described in D3 is no longer encompassed as well.

III.

The Examining Division states that claims 1-10, 12 and 14-16 are not inventive within the meaning of Art. 33(3) PCT.

Under item 3.2., reference is made to the large number of known sequences of delta-6-desaturases. Against this, the applicant would like to set the fact of the remarkable difference of the *Tetrahymena* delta-6-desaturase, as has already been mentioned above.

Item 3.3. refers to D1 as being the closest state of the art. In this regard, we should point out, once again, that D1 describes a different activity (delta-9-desaturase). Furthermore, D1 does not disclose either an isolated protein or a nucleotide sequence. Consequently, D1 in no way makes it obvious to a skilled person how he might be able to obtain a nucleic acid which encodes a *Tetrahymena* delta-6-desaturase.

However, we should also like to refer to the enclosed publication. In this study, an attempt was made to clone the *Tetrahymena thermophila* delta-6-desaturase on the basis of sequence homologies deduced from known delta-6-desaturases. This attempt was not successful (see page 64, lines 12 and 13, and page 65, lines 5 and 6)! The supposition was expressed that it was not possible to clone *Tetrahymena thermophila* delta-6-desaturase using conserved sequence segments (see page 76, lines 26-29). The applicant therefore respectfully informs you that the isolation of the gene encoding the *Tetrahymena thermophila* delta-6-desaturase was associated with the requisite inventive step.

With regard to item VIII:

The Examining Division correctly observes that claim 14 could also encompass transgenic humans and is therefore not admissible in this form. We have amended the claim such that we specify the claimed transgenic organisms as being nonhuman.

The Examining Division furthermore explains that all nucleic acids as claimed in claim 1 encode *Tetrahymena* delta-6-desaturases and that claim 2 ("... from a ciliate ...") is therefore superfluous. The applicant should like to point out that claim 1 encompasses nucleic acids encoding a *Tetrahymena* delta-6-desaturase or a functional variant thereof. It is not specified that the functional variant of the nucleic acid must also be derived from *Tetrahymena*. On the contrary, it is to be expected that similar delta-6-desaturases will be present in various other organisms, which delta-6-desaturases will all, however, as explained above, differ substantially from the previously known delta-6-desaturases. In order to underscore this fact, the new claim 1 specifies that the functional variant must exhibit a sequence homology of at least 70% with the amino acid sequence of the *Tetrahymena* delta-6-desaturase. It therefore also makes sense to restrict the nucleic acid sequences in claim 2 to being of ciliate origin.

[signature]

Dr. Greiber

Enclosures:

- “Studies on heterologous protein expression and on *Metabolic Engineering* in *Tetrahymena thermophila*”, U. Flachenäcker, April 1999, Degree dissertation at the Technical University Berlin, School of Food Science and Biotechnology.
- Amended claims 1, 11, 13 and 14.

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
22. März 2001 (22.03.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/20000 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/52,
C07K 14/44, C12N 9/02, 1/10, C07K 16/20

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): AXIVA GMBH [DE/DE]; Industriepark
Hoechst, 65926 Frankfurt am Main (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/08778

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
8. September 2000 (08.09.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RÜSING, Matthias
[DE/DE]; Lindenthalgürtel 75, 50935 Köln (DE). KIY,
Thomas [DE/DE]; Loreleystrasse 9, D-65929 Frankfurt
am Main (DE). DOMINITZKI, Annette [DE/DE];
Hechtersheimer Berg 25, 55270 Klein-Winternheim (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Anwälte: LUDERSCHMIDT, Wolfgang usw.; John-F.-
Kennedy-Strasse 4, D-65189 Wiesbaden (DE).

(30) Angaben zur Priorität:
199 43 270.8 10. September 1999 (10.09.1999) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,

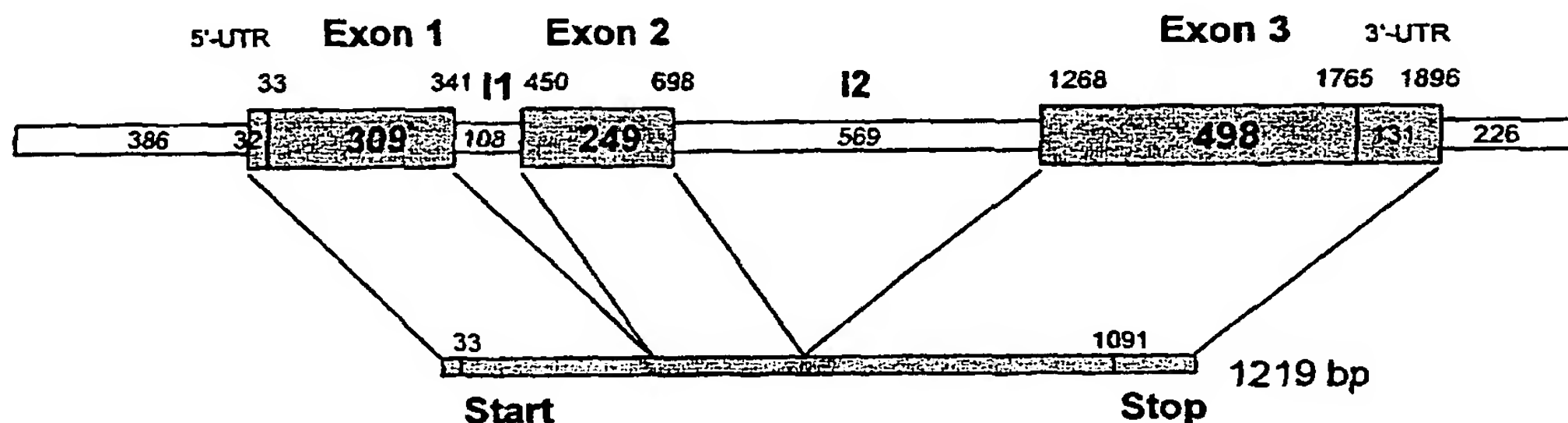
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NUCLEIC ACID WHICH IS OBTAINED FROM TETRAHYMENA AND WHICH CODES FOR A DELTA-6-DE-
SATURASE, THE PRODUCTION THEREOF AND USE

(54) Bezeichnung: NUCLEINSÄURE AUS TETRAHYMENA KODIEREND FÜR EINE DELTA-6-DESATURASE, IHRE HER-
STELLUNG UND VERWENDUNG

Struktur des $\Delta 6$ -Desaturase Gens

STRUCTURE OF THE $\Delta 6$ -DESATURASE GENE



WO 01/20000 A1

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acid(s) which is/are obtained from tetrahymena and which code(s) for a ciliate-specific delta-6-desaturase that is involved in the biosynthesis of commercially valuable, multiply unsaturated fatty acids (so-called PUFA: polyunsaturated fatty acids). The inventive nucleotide sequence and the polypeptide sequence that can be obtained therefrom exhibit a surprisingly low sequence identity compared to other known natural desaturases. The invention also relates to the use of the nucleic acid(s) for overexpression in ciliates, preferably tetrahymena, in particular, *Tetrahymena thermophila*, with the aim of increasing the production of delta-6 unsaturated fatty acids, especially GLA.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäure(n) aus Tetrahymena, die für eine ciliatenspezifische delta-6-Desaturase kodiert, welche an der Biosynthese von kommerziell wertvollen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (sog. PUFA engl.: polyunsaturated fatty acids) beteiligt ist. Die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz und die daraus erhältliche Polypeptidsequenz zeigen eine überraschend geringe Sequenzidentität zu anderen bekannten natürlichen Desaturasen. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der Nukleinsäure(n) zur Überexpression in Ciliaten, vorzugsweise Tetrahymena, insbesondere *Tetrahymena thermophila*, mit dem Ziel einer gesteigerten Produktion von delta-6 ungesättigten Fettsäuren, insbesondere der GLA.



CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Für Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

NUCLEINSÄURE AUS TETRAHYMENA KODIEREND FÜR EINE DELTA-6-DESATURASE, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine delta-6-Desaturase aus Tetrahymena, ihre kodierende Nukleinsäure sowie ihre Herstellung und Verwendung.

Die Erfindung betrifft eine Nukleinsäure aus Tetrahymena die für eine ciliatenspezifische delta-6-Desaturase kodiert, welche an der Biosynthese von kommerziell wertvollen mehrfach ungesättigten Fettsäuren (sog. PUFA engl.: polyunsaturated fatty acids) in Eukaryoten beteiligt ist. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und die daraus erhältlichen Polypeptide zeigen dabei eine überraschend geringe Sequenzidentität zu anderen bekannten natürlichen Desaturasen. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der Nukleinsäuren zur Überexpression in Eukaryoten insbesondere Ciliaten, vorzugsweise Tetrahymena, besonders bevorzugt *Tetrahymena thermophila*, mit dem Ziel der gezielten Modifikation des Fettsäurespektrums, insbesondere der Steigerung der PUFA-Bildung.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren sind erhältlich aus Ciliaten, vorzugsweise aus Tetrahymena, besonders bevorzugt aus *Tetrahymena*

thermophila, einem GLA produzierenden Organismus mit sehr hohem GLA-Gehalt.

In Figur 1 ist ein allgemeines Schema der Biosynthese von PUFAs und den beteiligten Enzymen in Eukaryoten (modifiziert nach Gill & Valivety, Trends Biotechnol. 1997, 15:401-409) dargestellt. Die Umwandlung von Stearinsäure (18:0) zu Ölsäure (18:1 Δ^9) wird durch eine delta 9-Desaturase katalysiert. Ölsäure wird durch eine delta 12-Desaturase in Linolsäure (18:2 $\Delta^9,12$; kurz LA) umgewandelt, die wiederum durch eine delta-6-Desaturase in γ -Linolensäure (18:3, $\Delta^6,9,12$; kurz: GLA), bzw. durch eine delta 15-Desaturase in α -Linolensäure (18:3 $\Delta^9,12,15$; kurz: ALA) umgewandelt wird. Die Verlängerung der Fettsäuren wird durch Elongasen katalysiert, wodurch z. B. aus γ -Linolensäure Dihomo- γ -Linolensäure (20:3 $\Delta^8,11,15$; kurz: DGLA) gebildet wird, die wiederum durch eine delta 5-Desaturase zu Arachidonsäure (20:4 $\Delta^5,8,11,15$; kurz: ARA) umgewandelt wird, einem direkten Vorläufer physiologisch wirksamer Eicosanoide, wie z. B. Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane, Leukotriene. Bei der Bildung der PUFAs, die sich von GLA ableiten (nachfolgend delta 6-ungesättigte Fettsäuren genannt), hat sich die Umwandlung von LA zu GLA durch die delta-6-Desaturase als limitierender Schritt gezeigt (Huang YS & Mills DE (1996) γ -linolenic acid. Metabolism and its role in nutrition and medicine. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996).

Das Vorhandensein eines Enzymes mit delta-6-Desaturase Aktivität in *Tetrahymena setosa* und *T. pyriformis* ist bekannt (Peng, Y.M. und Elson, C.E. (1971) J. Nutr. 101, 1177-1184), aber ein homogenes Protein mit einer solchen Aktivität aus einem Ciliaten wurde bisher nicht zur Verfügung gestellt (z.B. Koll, M. und Erwin, J.A. (1990) J. Protozool. 37(3), 229-237).

Da Vertebraten keine Doppelbindungen hinter Position 9 in Fettsäuren einfügen können, sind ungesättigte Fettsäuren wie LA und ALA essentielle Nährstoffe, die von Vertebraten nicht synthetisiert werden können (siehe Figur 1), und in der Ernährung hauptsächlich aus pflanzlichen Quellen stammen. LA kann von Säugern durch eine delta-6-Desaturase in GLA umgewandelt werden - eine ARA-Vorstufe - die ein essentieller Vorläufer der meisten Prostaglandine ist. Die Bildung von Stearidonsäure (18:4 Δ 6,9,12,15) - einem Vorläufer der EPA - aus ALA wird ebenfalls mittels delta-6-Desaturase katalysiert. Die delta-6-Desaturase ist damit der erste essentielle Schritt in der Biosynthese der Eicosanoide (siehe Figur 1).

Es hat sich gezeigt, daß die Aktivität der delta-6-Desaturase bei Säugern durch Faktoren wie z. B. Alkoholkonsum, Streß, Mangelernährung und Alterungsprozesse beeinträchtigt werden kann (Huang & Mills, 1996; Horrobin (1990) *Rev. Contemp. Pharmacother.* 1: 1-45; Bolton-Smith C et al. (1997) *Eur. J. Clin. Nutr.* 51:619-624; Leventhal LJ et al. (1993) *Ann. Intern. Med.* 119:867-873). Dies führt zu einer Unterversorgung mit GLA und damit letztlich zu einem Mangel der aus GLA abgeleiteten Moleküle wie ARA und der daraus gebildeten physiologisch wichtigen Eicosanoide, da es sich wie bereits erwähnt bei der Bildung der GLA aus LA durch die delta-6-Desaturase um einen limitierenden Schritt der PUFA-Synthese handelt (Brenner RR (1976) *Adv. Exp. Med. Biol.* 83:85-101; Nakahara T et al. (1993) *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 42:242-253; Chapkin, RS (1998) *Reappraisal of the essential fatty acids. In: Fatty acids in food and their health implications*, 2nd ed. (Chow CK, ed) Marcel Dekker, New York, NY). Die Zuführung von GLA kann sowohl einen reduzierten endogenen Spiegel von delta-6 ungesättigten Fettsäuren ausgleichen, als auch einen erhöhten Bedarf an diesen Fettsäuren decken (Horrobin (1990)). Für die Biosynthese von aus GLA abgeleiteten Molekülen ist deshalb die

Aufnahme von GLA durch die Nahrung vorteilhaft (Fan, YY & Chapkin, RS (1998) J. Nutr. 128:1411-1414).

Der Befund, daß GLA vielfältige positive Einflüsse auf den menschlichen Körper ausübt, wurde inzwischen durch eine Vielzahl wissenschaftlicher Studien untermauert. So wurde die positive Wirkung der GLA z. B. auf atopische Ekzeme (Shimasaki, H: PUFA content and effect of dietary intake of γ -linolenic acid-rich oil on profiles of n-6, n-3 metabolites in plasma of children with atopic eczema. J. Clin. Biochem. Nutr. (1995), 19(3), 183-192.), Rheumatische Arthritis (Zurier RB, Rossetti RG, Jacobson EW, DeMarco DM, Liu NY, Temming JE, White BM, Laposata M (1996) γ -linolenic acid treatment of rheumatoid arthritis: A randomized, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 39(11) 1808-1817), Atherosklerose (Leng GC, Lee AJ, Fowkes FGR, Jepson RG, Lowe GDO, Skinner ER, Mowat BF, Randomized controlled trial of γ -linolenic acid and eicosapentaenoic acid in peripheral arterial disease, Clinical Nutrition, (1998) 17/6 265-271.), diabetische Neuropathie (Pfeifer MA, Schumer MP (1995) Clinical trials of diabetic neuropathy: past, present, and future. Diabetis 44(12) 1355-61), Migräne (Wagner W, Nootbaar-Wagner U (1997) Prophylactic treatment of migraine with γ -linolenic and alpha-linolenic acids, Cephalalgia 17/2 127-130), Schizophrenie (Vaddadi, KS (1982) Some observations on the use of prostaglandin E1 precursor in the treatment of schizophrenia. Biol. Aspects Schizophr. Addict. 183-91. Publisher: Wiley, Chichester, UK) und Krebs (Kairemo KJA, Jekunen AP, Korppi-Tommola ET, Pyrhonen SO (1997) Effects of lithium γ -linolenate on the perfusion of liver and pancreatic tissues in pancreatic cancer. Anticancer Research 17/5 B 3729-3736.) durch klinische Studien nachgewiesen. In diesen Studien wurde sowohl eine statistisch als auch eine klinisch signifikante Verbesserung des Krankheitsbildes erzielt. Die Wirkung der GLA beruht dabei vor allem auf der Bildung von

Eicosanoiden (Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane, Leukotriene), für die GLA ein Vorläufermolekül in der Biosynthese darstellt (Figur 1).

Aufgrund dieser positiven Eigenschaften besteht ein breites Anwendungsspektrum für GLA in der Pharma-, Kosmetik-, Tierfutter- und Lebensmittelindustrie (Horrobin (1990), Horrobin (1992) Prog. Lipid Res. 31:163-194; Chapkin (1998), Fan & Chapkin (1998).

Die meisten PUFAs aus Menschen und Tieren stammen entweder direkt aus der Ernährung oder entstehen durch die Umsetzung der durch die Ernährung zugeführten essentiellen Fettsäuren durch Desaturasen und Elongasen. Deshalb sind die Gene der PUFA-Biosynthese aus Organismen, in denen diese PUFAs natürlicherweise vorkommen, von großem kommerziellen Interesse. Durch die gezielte, funktionelle Expression dieser Gene in Organismen oder Zellen kann eine kommerzielle Produktion von PUFAs in diesen Systemen erreicht werden. Aus diesem Grund besteht ein Bedarf an Genen für Desaturasen und Elongasen der PUFA-Biosynthese, sowie für die kommerzielle Gewinnung von PUFAs und PUFA-Ölen durch zuverlässige ökonomische Methoden mit Hilfe dieser Gene.

Keine der kommerziell genutzten Ölsaaten produziert GLA. GLA kommt dagegen nur im Öl der Samen verschiedener Pflanzen wie der Nachtkerze (*Oenothera biennis*, ca. 10% GLA), Borretsch (*Borago officinalis*, ca. 23%) und der Schwarzen Johannisbeere (*Ribes nigrum*, ca. 18%) vor. Daneben sind auch verschiedene Mikroorganismen als Quellen für GLA bekannt, wie z. B. die Pilze *Mucor* und *Mortierella* (bis zu ca. 25%), die Blaualge *Spirulina* (ca. 12-18%) und andere. Als besonders GLA-reiche Quelle wurden Ciliaten wie z. B. *Tetrahymena* (bis zu 47%; Hill, DL (1972) The biochemistry and physiology of Tetrahymena. Chapter 3, 46-73. Academic press, New York, London; Erwin, J & Bloch, K (1963)

J. Biol. Chem. 238:1618-1624) beschrieben. Eine gute Übersicht über natürliche Quellen von GLA geben Phillips & Huang (Phillips JC, Huang YS (1996) Natural sources and biosynthesis of γ -linolenic acid: an overview. 1-13 In: γ -linolenic acid. Metabolism and its role in Nutrition and medicine. Huang YS, Mills DE (eds.) AOCS Press, Champaign, Illinois, 1996).

Die kommerzielle Gewinnung von GLA aus diesen natürlichen Quellen ist jedoch mit einigen Nachteilen verbunden. Sowohl die Qualität als auch die Quantität der aus diesen Organismen gewonnen Öle schwanken, und teilweise weisen die Öle eine sehr heterogene Zusammensetzung auf, was aufwendige und teure Reinigungsschritte nötig macht um die GLA anzureichern. Der Anbau GLA-haltiger Pflanzen ist darüberhinaus nicht sehr wirtschaftlich (Hansen CE et al. (1991) J. Sci. Food Agric. 54:309-312). Für die Gewinnung von GLA-haltigem Öl hat sich gezeigt, daß die Raum/Zeit-Ausbeute bei einigen GLA-produzierenden Mikroorganismen im Vergleich zu höheren Pflanzen deutlich besser ist. Aus diesem Grunde bietet die fermentative Herstellung von GLA durch Mikroorganismen eine vielversprechende Alternative zu anderen GLA-Quellen. Das Fettsäurespektrum vieler Mikroorganismen ist oft recht einfach im Vergleich zu höheren Organismen, was grosse Vorteile bei der Reinigung bietet.. Darüber hinaus ist die fermentative Herstellung nicht von externen Faktoren wie Wetter, Nahrungsangebot etc. abhängig. Ausserdem sind auf diese Weise hergestellte PUFAs weitgehend frei von Kontaminationen die z.B. auf Umweltverschmutzung zurückzuführen sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch fermentative Prozesse gewonnene GLA im Gegensatz zu GLA aus natürlichen Quellen keinen Schwankungen in der Verfügbarkeit unterliegen.

Es gab bereits Versuche, die fermentative Gewinnung von GLA zu etablieren (Ratledge C (1993) Trends Biochem. 11:278-284; Ratledge C (1989) Biochem. Soc. Trans. 17:1139-1141; Gosselin Y et al. (1989) Biotechnol. Lett. 11:423-426; WO86/03518). Für eine kommerzielle, fermentative GLA-Produktion durch Mikroorganismen ist aber eine Steigerung des GLA-Gehaltes wünschenswert, da die Fermentation PUFA-produzierender Mikroorganismen als relativ aufwendig und teuer und damit als nicht sehr wirtschaftlich erachtet wird (supra Ratledge 1993). Aufgrund seines relativ hohen GLA-Gehalts (supra) ist besonders *Tetrahymena thermophila* für eine fermentative Gewinnung von GLA geeignet. *Tetrahymena* kann gut im Fermenter kultiviert werden und es können hohe Zelldichten erreicht werden (Kiy, T. & Tiedtke (1992) Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 576–579; Kiy, T. & Tiedtke, A. (1992) Appl. Microbiol. Biotechnol. 38, 141–146).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Nukleinsäuren aus *Tetrahymena* bereitzustellen, welche für ein Polypeptid mit der Aktivität einer delta-6-Desaturase kodieren, und deren funktionelle Expression und Überexpression in einem Wirtsorganismus, vorzugsweise in *Tetrahymena*, zwecks Anreicherung von GLA und/oder delta 6-ungesättigten Fettsäuren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Nukleinsäure gemäß SEQ ID No.: 1 kodierend für eine delta-6-Desaturase mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.: 2 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 15 oder 20 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 100 Nukleotiden, vor allem mit mindestens 300 Nukleotiden (nachfolgend "erfindungsgemäße Nukleinsäure(n)" genannt). Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls eine Nukleinsäure gemäß SEQ ID No.: 3, enthaltend die genomische Sequenz und die neben der kodierenden Sequenz für eine delta-6-Desaturase auch nicht kodierende

Nukleinsäuresequenzen wie Introns, Promoter und flankierende Sequenzen, beinhaltet.

Die vollständige Nukleinsäure gemäß SEQ ID No.: 1 kodiert für ein Protein mit 352 Aminosäuren und einer theoretischen molekularen Masse von 41,8 kDa. Die Sequenzanalysen gemäß der vorliegenden Erfindung bestätigen, daß es sich bei der Nukleinsäure um eine Nukleinsäure handelt, die für eine delta-6-Desaturase aus *Tetrahymena* kodiert.

Durch einen Homologievergleich konnte die aus der Nukleinsäuresequenz (SEQ ID No.: 1) abgeleitete Proteinsequenz gemäß SEQ ID No.: 2 als eine delta-6-Desaturase identifiziert werden. Für den Homologievergleich wurde die Funktion BLASTP (Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402) benutzt. Als homologe Proteine wurden Desaturasen, insbesondere delta-6-Desaturasen (E.C. 1.14.99.25; Linoleoyl-CoA desaturase) aus den Datenbanken identifiziert (siehe Figur 2). Die bekannten delta-6-Desaturasen weisen dabei maximal eine Identität von 25% zu der erfindungsgemäßen Polypeptidsequenz auf (siehe Figuren 3A-3E). Ein Multiples Alignment verschiedener bekannter delta-6-Desaturasen mit der erfindungsmäßen Polypeptidsequenz ist in Figur 4 gezeigt. Die Homologien finden sich insbesondere in konservierten Domänen, wie den Histidinboxen (Los & Murata, 1998. *Biochem. Biophys. Acta* 1394: 3-15; Shanklin, J et al. 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6743-6747). Darüberhinaus konnte wie bei anderen eukaryotischen delta-6-Desaturasen eine Cytochrom b5 Domäne (Lederer, F. (1994) *Biochimie* 76, 674-692; Cho et al. *J. Biol. Chem.* 1999, 274(1): 471-477) identifiziert werden. Obwohl die erfindungsgemäße Polypeptidsequenz sich als delta-6-Desaturase identifizieren läßt, unterscheidet sie sich wesentlich von anderen delta-6-Desaturasen. Auffällig ist vor allem, daß die Sequenz mit 352 Aminosäuren rund 20% kürzer als andere eukaryotischen delta-6-Desaturasen ist. Darüberhinaus weist die Sequenz in stark konservierten

Bereichen eine Vielzahl von einzigartigen Abweichungen auf. So ist z.B. das bei anderen delta-6-Desaturasen zu 100% konservierte HHLFP-Motiv abgewandelt in HHFFP (siehe Figur 4). Die Identität der erfindungsgemäßen Polypeptidsequenz zu bekannten Desaturasen ist aus diesen Gründen überraschend gering.

Durch die gezielte Überexpression der Desaturase z. B. in *Tetrahymena* kann das Fettsäurespektrum signifikant modifiziert werden (s. Tabelle 1 und 2). Dabei kommt es zu einer Verschiebung des Verhältnisses der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren hin zu deutlich mehr ungesättigten Fettsäuren. Von besonderem Interesse ist dabei die Steigerung der Produktivität der GLA, die so erreicht werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, und insbesondere eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz bzw. eine funktionelle Variante der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No 1 von Pos. 33 bis Pos. 1091. Die beiden Positionen bestimmen gemäß der vorliegenden Erfindung den Start und das Ende des kodierenden Bereiches.

Unter dem Begriff "funktionelle Variante" versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nukleinsäure, die funktionell mit der delta-6-Desaturase aus *Tetrahymena* verwandt ist. Beispiele verwandter Nukleinsäuren sind beispielsweise Nukleinsäuren aus anderen Ciliaten-Zellen oder allelische oder degenerierte Varianten. Die Erfindung umfaßt ebenfalls funktionelle Varianten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die aufgrund des ungewöhnlichen Codongebrauchs (siehe: Wuitschick JD, Karrer KM (1999) Analysis of genomic G + C content, codon usage, initiator codon context and translation termination sites in *Tetrahymena thermophila*. J. Eukaryot. Microbiol. 1999 46(3):239-47) eine Anpassung

der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in ausgewählten Expressionssystemen erfordern. Zum einen betrifft dies den Austausch der Codons TAA und TAG, welche in Ciliaten Glutamin kodieren und in den meisten anderen Expressionssystemen Stop-Codons sind, in CAA und CAG. Darüber hinaus ist es dem Fachmann bekannt die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an die jeweilige besondere Codonpräferenz (sog. "Codon-usage") verschiedener Expressionssysteme optimal anzupassen. Die Modifizierung der Nukleinsäuren kann in bekannter Weise durch einen gezielten Austausch von Basen erfolgen oder die erforderliche Nukleinsäure wird aus künstlich hergestellten Oligonukleotiden gewonnen. Die Anpassung der Sequenz kann z. B. auf der Basis der bekannten Codongebrauch-Tabellen (z. B. im Internet: Codon usage tabulated from Genbank: <http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/CUTG.html>) der bevorzugten Expressionssysteme durchgeführt werden. Auch umfaßt die vorliegende Erfindung Varianten von Nukleinsäuren, die nur Teile der Nukleinsäure enthalten.

Im weiteren Sinne versteht man unter dem Begriff "Varianten" gemäß der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren, die eine Homologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 60%, vorzugsweise von ca. 75%, insbesondere von ca. 90% und vor allem von ca. 95% aufweisen.

Die Teile oder Fragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können beispielsweise zur Herstellung einzelner Epitope, als Sonden zur Identifizierung weiterer funktioneller Varianten oder als Antisense-Nukleinsäuren verwendet werden. Beispielsweise eignet sich eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 8 Nukleotiden als Antisense-Nukleinsäure, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 15 Nukleotiden als Primer beim PCR-Verfahren, eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 20

Nukleotiden für die Identifizierung weiterer Varianten und eine Nukleinsäure aus mindestens ca. 100 Nukleotiden als Sonde.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Nukleinsäure eine oder mehrere nicht-kodierende Sequenzen (UTR u.a.). Die nicht-kodierenden Sequenzen sind beispielsweise Intronsequenzen oder regulatorische Sequenzen, wie Promotor- oder Enhancer-Sequenzen, zur kontrollierten Expression des delta-6-Desaturase kodierenden Gens. Daher ist ein Gegenstand der Erfindung eine erfindungsgemäße Nukleinsäure gemäß SEQ ID No.: 3, welche aus *Tetrahymena thermophila* isoliert werden kann und die genomische Sequenz der delta-6-Desaturase mit Introns, Promoter und UTRs darstellt.

In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure daher in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor enthalten.

Die Expressionsvektoren können beispielsweise prokaryotische oder eukaryotische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryotische Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z.B. der T7 Expressionsvektor pGM10 (Martin, 1996), welcher für einen N-terminalen Met-Ala-His6-Tag kodiert, der eine vorteilhafte Reinigung des exprimierten Proteins über eine Ni²⁺-NTA-Säule ermöglicht. Als eukaryotische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* eignen sich z.B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids Res., 22, 5767), für die Expression in Insektenzellen z.B. Baculovirus-Vektoren wie in EP-B1-0127839 oder EP-B1-0549721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z.B. SV40-Vektoren, welche allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die Wirtszelle geeignete regulatorische Sequenzen, wie z.B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (s. z.B. EP-B1-0154133), den ADH-2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 2674), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor für die Expression in Insektenzellen (s. z.B. EP-B1-0127839) oder den frühen SV40-Promotor oder LTR-Promotoren z.B. von MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus; Lee et al. (1981) *Nature*, 214, 228).

Für die Transformation von und die Expression in *Tetrahymena* eignen sich z.B. die von Gaertig et al. ((1999) *Nature Biotech.* 17: 462-465) oder Gaertig & Kapler ((1999) *Methods in Cell Biol.* 62:485-500) beschriebenen Vektoren.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können beispielsweise chemisch anhand der in SEQ ID No.: 1 und 3 offenbarten Sequenzen oder anhand der in SEQ ID No.: 2 offenbarten Peptidsequenz unter Heranziehen des genetischen Codes z.B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (s. z.B. Uhlman, E. & Peyman, A. (1990) *Chemical Reviews*, 90, 543, No. 4). Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in die Hand zu bekommen, ist die Isolierung aus einer geeigneten Genbank, von einem Organismus, der delta-6-Desaturase Aktivität besitzt, anhand einer geeigneten Sonde (s. z.B. Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2nd Edition, Cold Spring Harbor, New York). Als Sonde eignen sich beispielsweise einzelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von ca. 100 bis 1000 Nucleotiden, vorzugsweise mit einer Länge von ca. 200 bis 500 Nucleotiden, insbesondere mit einer Länge von ca. 300 bis 400 Nucleotiden, deren Sequenz aus der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No.: 1 oder 3 abgeleitet werden kann.

Daher betrifft die Erfindung ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, wobei die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch das Polypeptid selbst mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.: 2 oder einer funktionellen Variante davon, und Teile davon mit mindestens sechs Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 12 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 65 Aminosäuren und vor allem mit mindestens 150 Aminosäuren (nachfolgend "erfindungsgemäßes Polypeptid" genannt). Beispielsweise kann ein ca. 6-12, vorzugsweise ca. 8 Aminosäuren-langes Polypeptid ein Epitop enthalten, das nach Kopplung an einen Träger zur Herstellung von spezifischen poly- oder monoklonalen Antikörper dient (siehe hierzu z. B. US 5,656,435). Polypeptide mit einer Länge von mindestens ca. 65 Aminosäuren können auch direkt ohne Träger zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörper dienen.

Unter dem Begriff "funktionelle Variante" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man Polypeptide, die funktionell mit dem erfindungsgemäßen Peptid verwandt sind, d.h. eine delta-6-Desaturase Aktivität aufweisen.

Im weiteren Sinne versteht man darunter auch Polypeptide, die eine Sequenzhomologie, insbesondere eine Sequenzidentität von ca. 70%, vorzugsweise von ca. 80%, insbesondere von ca. 90%, vor allem von ca. 95% zu dem Polypeptid mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.: 2 haben.

Des weiteren sind Polypeptide bevorzugt die konservierte Bereiche von Histidinboxen und eine Cytochrome b5 Domäne aufweisen. Besonders bevorzugt sind erfindungsgemäße Polypeptide die ein HHFFP – Motiv enthalten.

Ferner zählen hierzu auch Deletionen des Polypeptids im Bereich von ca. 1 - 60, vorzugsweise von ca. 1 - 30, insbesondere von ca. 1 - 15, vor allem von ca. 1 - 5 Aminosäuren. Beispielsweise kann die erste Aminosäure Methionin fehlen, ohne daß die Funktion des Polypeptids wesentlich verändert wird. Daneben zählen hierzu auch Fusionsproteine, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten, wobei die Fusionsproteine selbst bereits die Funktion einer delta-6-Desaturase haben oder erst nach Abspaltung des Fusionsanteils die spezifische Funktion bekommen können. Vor allem zählen hierzu Fusionsproteine mit einem Anteil von insbesondere nicht-ciliaten Sequenzen von ca. 1 - 200, vorzugsweise ca. 1 - 150, insbesondere ca. 1 - 100, vor allem ca. 1 - 50 Aminosäuren. Beispiele von nicht-Ciliaten Peptidsequenzen sind prokaryotische Peptidsequenzen, z.B. aus der Galactosidase von E. coli oder ein sogenannter Histidin-Tag, z.B. ein Met-Ala-His6-Tag. Ein Fusionsprotein mit einem sogenannten Histidin-Tag eignet sich besonders vorteilhaft zur Reinigung des exprimierten Proteins über Metallionen-haltige Säulen, beispielsweise über eine Ni²⁺-NTA-Säule. "NTA" steht für den Chelator "nitrilotriacetic acid" (Qiagen GmbH, Hilden).

Die Teile des erfindungsgemäßen Polypeptids repräsentieren beispielsweise Epitope, die spezifisch von Antikörpern erkannt werden können.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann beispielsweise durch Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in einem geeigneten

Expressionssystem, wie oben bereits beschrieben, nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden hergestellt werden. Als Wirtszellen eignen sich beispielsweise die E. coli Stämme DH5, HB101 oder BL21, der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, die Insektenzelllinie Lepidopteran, z.B. von *Spodoptera frugiperda*, oder tierische Zellen wie COS, Vero, 293 und HeLa, die alle allgemein erhältlich sind.

Insbesondere die genannten Teile des Polypeptids können auch mit Hilfe der klassischen Peptidsynthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Sie eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antiseren, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich daher auf ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids, wobei eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert und gegebenenfalls isoliert wird.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung bezieht sich auch auf Antikörper, die mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid spezifisch reagieren, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Koppelung an geeignete Träger, wie z.B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können.

Die Antikörper sind entweder polyklonal oder monoklonal. Die Herstellung, die ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Erfindung darstellt, erfolgt beispielsweise nach allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon,

gegebenenfalls in Anwesenheit von z.B. Freund's Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (s. z.B. Diamond, B.A. et al. (1981) The New England Journal of Medicine, 1344). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z.B. über Säulenchromatographie reinigen. Bevorzugt wird eine Affinitätsreinigung der Antikörper, bei der beispielsweise das C-terminale Desaturase-Fragment an eine NHS-aktivierte HiTrap-Säule gekoppelt wurde.

Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293) hergestellt werden.

Obwohl bereits delta-6-Desaturasen aus anderen Organismen beschrieben wurden, bietet sich *Tetrahymena*, aufgrund der besonders hohen Raum/Zeit-Ausbeute bei der Produktion von GLA sowohl als Ausgangspunkt für die Erzeugung hochproduktiver, kommerziell bedeutender Stämme durch gentechnische Methoden, als auch als Quelle für die Gene der PUFA-Biosynthese an. In der vorliegenden Erfindung wird dementsprechend die delta-6-Desaturase und ihre Verwendung aus dem GLA-produzierenden Ciliaten *Tetrahymena thermophila* beschrieben.

Die gezielte Modifizierung der Zusammensetzung des Fettsäurespektrums durch gentechnische Methoden wird in Napier J et al. (Curr. Opin. Plant Biol. (1999) 123-127), Murphy & Piffanelli (Soc. Exp. Biol. Semin. Ser. 67 (Plant Lipid Biosynthesis), (1998) 95-130) und Facciotti & Knauf (In: Adv. Photosynth. 6: Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. Siegenthaler & Murata (eds.) Kluwer Academic Publishers. Netherlands. (1998) 225-248) beschrieben.

In den Schriften WO98/46763, WO98/46764 und WO98/46765 werden Desaturasen aus dem Pilz *Mortierella* und die Verwendung der Gene zur Produktion von PUFAs, sowie einige teilweise partielle Sequenzen von Desaturasen beschrieben. In WO93/06712 und WO96/21022 werden $\Delta 6$ -Desaturasen aus einem Cyanobakterium und aus Borretsch sowie die Verwendung dieser Sequenzen zur Produktion von PUFAs in Cyanobakterien und Pflanzen beschrieben. In WO99/27111 wird eine Desaturase aus Nematoden und die Verwendung zur Produktion von PUFAs beschrieben. Aus der Literatur sind ebenfalls delta-6-Desaturasen bekannt. Es handelt sich dabei jedoch vor allem um delta-6-Desaturasen aus Pflanzen (*Borretsch* (Sayanova et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94: 4211–4216), *Phycosmitrella* (Girke et al. (1998) *Plant-J.* 1998 15(1): 39–48), *Sonnenblume* (Sperling et al. (1995) *Eur. J. Biochem.* 1995, 232: 798–805)), Pilzen (*Mortierella*), Tieren (*Maus*, *Ratte*, *Caenorhabditis* (Napier et al. (1998) *Biochem. J.* 330(2), 611–614)), Cyanobakterium (Reddy et al. (1993) *Plant Mol. Biol.* 1993, 293–300).

Ziel ist im allgemeinen die funktionelle, heterologe Expression dieser Gene in Kulturpflanzen, insbesondere Ölsaaten wie z.B. Raps, Sonnenblume und anderen. Die GLA-Ausbeuten sind in allen bisher veröffentlichten Fällen jedoch entweder sehr gering und/oder die durch "genetic engineering" erzeugten GLA-produzierenden Organismen mit delta-6-Desaturase-Aktivität sind ohne kommerzielle Bedeutung (Knutzon & Knauf (1998) *Soc. Exp. Biol. Semin. Ser.* 67:287–304).

Die Probleme und Schwierigkeiten das Fettsäurespektrum in transgenen Pflanzen gezielt zu modifizieren werden z.B. von Murphy (*Current Opinion in Biotechnology* (1999) 10:175–180) und Knutzon & Knauf (1998) beschrieben.

Aufgrund des beschriebenen hohen GLA-Gehalts von Tetrahymena ist es vorteilhaft die Gene der PUFA-Biosynthese aus diesem Organismus für die Entwicklung hochproduktiver, kommerziell bedeutender Stämme durch gentechnische Methoden zu benutzen. Durch die Möglichkeit, Tetrahymena gut in Massenkultur mit einer hohen Zelldichte zu kultivieren, ist es darüber hinaus vorteilhaft Tetrahymena selbst zur Erzeugung solcher hochproduktiver, kommerziell interessanter Stämme durch gentechnische Methoden zu benutzen. Desweiteren können neben Tetrahymena auch andere Organismen mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäure zur Produktion von GLA oder anderen delta 6-ungesättigten Fettsäuren benutzt werden.

Die Herstellung von GLA durch Fermentation von Tetrahymena ist besonders vorteilhaft aufgrund des recht einfachen Fettsäurespektrums verglichen mit höheren Organismen. Darüber hinaus wird eine fermentative Produktion nicht von externen Faktoren wie Wetter, Nahrungsangebot etc. beeinflusst. Ausserdem ist ein auf diese Weise gewonnenes Produkt weitgehend frei von Verunreinigungen, wie sie z.B. bei aus der Natur gewonnenen Produkten durch Umweltverschmutzung hervorgerufen werden können.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, kodierend für eine ciliatenspezifische delta-6-Desaturase aus Tetrahymena, können transgene Organismen erzeugt werden, welche GLA und delta 6-ungesättigte Fettsäuren produzieren, bzw. deren Gehalt an solchen Fettsäuren gegenüber Wildtypzellen (hier: *Tetrahymena thermophila*) deutlich erhöht ist (siehe Tabelle 1 und 2). Dabei handelt es sich bevorzugt um Ciliaten, besonders bevorzugt Tetrahymena, welche die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz enthalten, bzw. in funktioneller Weise exprimieren. Die Expression der Desaturase in dieser Weise führt zu einem relativen Anstieg von delta-6-ungesättigten Fettsäuren, bzw.

davon abgeleiteten Folgeprodukten, basierend auf einer veränderten Konzentration von Enzymen und Substraten der PUFA-Synthese. Die Erfindung findet Anwendung in der kommerziellen Produktion von PUFAs, insbesondere von GLA und davon abgeleiteten PUFAs oder anderen Folgeprodukten, die sich von GLA ableiten lassen, bzw. $\Delta 6$ -ungesättigten Fettsäuren (s. Figur 1: PUFA-Biosynthese). Neben GLA kann so z.B. durch die Desaturierung der ALA auch Stearidonsäure (18:4 $\Delta 6,9,12,15$) hergestellt werden, ein industriell vielfach genutzter Rohstoff.

In einer besonderen Ausführungsform kann durch die Verwendung der delta-6-Desaturase kodierenden erfindungsgemäßen Nukleinsäuren in funktioneller Kombination mit geeigneten regulativen Sequenzen eine verstärkte Expression des Enzyms der GLA-Gehalt in GLA-produzierenden Organismen erhöht werden, bzw. GLA in LA-produzierenden Organismen produziert werden. Von besonderem Interesse sind dabei z.B. ölproduzierende Organismen wie Sonnenblume, Raps, Soja aber auch andere. Darüber hinaus können durch die gleichzeitige Verwendung z. B. einer delta 12-Desaturase (z. B. Sakuradani E et al. (1999) Eur. J. Biochem. 261:812-820, Okuley et al. Plant Cell (1994) 6(1) 147-58) die besagten PUFAs in Organismen oder Zellen produziert werden, die keine oder nur wenig LA enthalten. Ebenfalls eine Kombination der drei an der GLA-Bildung beteiligten Desaturasen $\Delta 6$, $\Delta 9$ und $\Delta 12$ zur Produktion von GLA und delta 6-ungesättigte Fettsäuren ist möglich. Des weiteren ist die Kombination mit weiteren Genen der PUFA-Biosynthese (vgl. Figur 1) eine weitere bevorzugte Ausführung der Erfindung, wobei die GLA und delta 6-ungesättigte Fettsäuren mittels weiterer Enzyme umgesetzt werden, für die GLA als Substrat dient, wodurch z.B. ARA (20:4) und andere Moleküle, die sich von GLA ableiten, hergestellt werden können.

Außerdem kann die Erfindung zur Herstellung neuer GLA-haltiger Nahrungsquellen, bzw. von Nahrungsquellen die reich an Molekülen (insbesondere PUFAs, z. B. ARA) sind, die sich von GLA oder anderen Δ 6-ungesättigten Fettsäuren ableiten lassen, benutzt werden.

Die vorliegende Erfindung beschreibt weiterhin Expressionskonstrukte, die das delta-6-Desaturase Gen oder Teile davon enthalten, sowie die funktionelle Kombination der delta-6-Desaturase kodierenden Sequenz mit heterologen regulativen Sequenzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung transgener Organismen mit erhöhtem GLA-Gehalt (siehe Tabellen 1 und 2), durch die Verwendung der beschriebenen delta-6-Desaturase kodierenden DNA-Sequenz und der beschriebenen funktionellen Konstrukte des delta-6-Desaturase Gens.

Für die Isolierung von genomischer DNA und von mRNA, sowie die Herstellung von genomischer und cDNA-Banken sind eine Vielzahl gut etablierter Methoden bekannt (z.B. in Sambrook et al. (1989) in Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY). Die Herstellung geeigneter Vektoren, welche die in der Erfindung beschriebene Desaturase, bzw. Teile daraus enthalten, können mit dem Fachmann bekannten Methoden, wie sie z. B. in Ausubel et al. (Ausubel et al. (1995), Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, New York) und Sambrook et al. (1989) beschrieben sind, hergestellt werden.

Vektoren, welche die delta-6-Desaturase kodierende Sequenz enthalten, können durch Infektion, Transfektion, Elektroporation, Partikelbeschuß und anderen Methoden in Zellen eingeschleust werden. Mit Transformation ist hier generell die Einbringung fremder DNA in eine Zelle gemeint. Die Methoden dafür sind gut etabliert und können in für den

Fachmann bekannter Weise durchgeführt werden (z. B. Sambrook et al. (1989), Potrykus I (1991) Annu. Rev. Plant Biol. Plant Mol. Biol. 42:205-225, Christou P (1993) Curr. Opp. Biotech. 4:135-141).

Ebenso werden Vektoren beschrieben, welche die DNA-Sequenz der vorliegenden Erfindung oder Teile der Sequenz in funktioneller Kombination mit Promotoren, oder anderen regulativen Elementen, welche in einer Wirtszelle aktiv sind, enthalten. In einer bevorzugten Ausführung handelt es sich bei diesen regulativen Elementen um Nukleinsäuresequenzen, welche in Ciliaten, insbesondere Tetrahymena, funktionell aktiv sind, wie z. B. die Promotoren für Histon H4, α - und β -Tubulin und andere.

Ferner werden in der vorliegenden Erfindung Organismen beschrieben, welche die beschriebene Delta-6-Desaturase kodierende Sequenz rekombinant exprimieren. Dadurch besteht neben der Möglichkeit der Produktion von $\Delta 6$ -PUFAs in diesen Organismen z. B. auch die Möglichkeit die rekombinante delta-6-Desaturase oder Teile davon durch Standardmethoden der Proteinreinigung (z. B. Ausubel et al. (1995)) zu isolieren. Vektoren für eine Expression der delta-6-Desaturase kodierenden Sequenz in verschiedenen Organismen können nach dem Fachmann bekannter Weise hergestellt werden. Detaillierte Informationen über geeignete Vektoren finden sich z.B. in Sambrook et al. (1989), Goeddel, ed. (1990) Methods in Enzymology 185 Academic Press, und Perbal (1988) A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons, Inc.. Solche Vektoren enthalten vorzugsweise Sequenzelemente, welche die Expression beeinflussen, wie Promotoren, Enhancer-Elemente, "upstream" aktivierende Sequenzen etc.. Für die Expression eignen sich sowohl induzierbare als auch konstitutive Promotoren, oder z. B. gewebespezifische Promotoren. Für die Expression in pflanzlichen

Zellen eignet sich z. B. der "cauliflower mosaic virus" (CaMV) 35S Promoter (Restrepo et al. (1990) Plant Cell 2 987) oder z. B. Promotoren, die bei der Samenentwicklung aktiviert werden.

Vorzugsweise handelt es sich bei den benutzten Vektoren um Shuttle-Vektoren (Wolk et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1561-1565, Bustos et al. (1991) J. Bacteriol. 174: 7525-7533).

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Nukleinsäure unter Kontrolle eines starken Promotors (wie z. B. dem Tetrahymena β -Tubulin-Promoter, Gaertig et al. (1999) Nature Biotech.) in Tetrahymena exprimiert. Die Transformation kann vorzugsweise nach Gaertig et al. (1999) Nature Biotech. 17: 462-465 (oder z. B. nach Gaertig & Gorovsky (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9196-9200) beschriebenen Methoden erfolgen. Als regulative Elemente für die Expression können z. B. die Promotoren von α - oder β -Tubulin aus *Tetrahymena thermophila* benutzt werden. Die transformierten Tetrahymena werden in selektiven Medien identifiziert, angereichert und kultiviert. Aus den Zellen können die Lip(o)ide nach Standardmethoden isoliert werden (z.B. Dahmer et al., (1989) Journal of American Oil Chemical Society 66, 543). Die Methylester der Fettsäuren können durch Gaschromatographie analysiert werden.

Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen isolierten Nukleinsäuren oder Teile daraus können auch zur Isolierung verwandter Gene aus anderen Organismen, insbesondere z. B. aus anderen Protisten, insbesondere Ciliaten, benutzt werden. Für die Isolierung homologer Gene kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder Teile davon als markierte Probe eingesetzt werden. Durch die Hybridisierung der Probe an isolierte Nukleinsäuren aus anderen Organismen können homologe

Nukleinsäure-Sequenzen identifiziert und isoliert werden. Die Markierung der Probe kann in einer für den Fachmann bekannten Weise durchgeführt werden (Ausubel, Sambrook (supra)). Für die Markierung der Probe eignen sich z.B. radioaktive Nukleotide oder Nukleotide die mit detektierbaren Molekülen wie z.B. fluoreszierenden Molekülen, Digoxigenin, Biotin, magnetischen Molekülen oder Enzymen verknüpft sind. Die Identifizierung und Isolierung homologer DNA-Sequenzen erfolgt durch den Nachweis der Markierung nach einer Hybridisierung der Probe an heterologe DNA. Für die Suche nach homologen Sequenzen bieten sich cDNA-Banken oder genomische Banken an. Für den Nachweis homologer Sequenzen eignen sich darüber hinaus Southern und Northern-Blots. Alternativ kann homologe DNA, die mit der markierten Probe hybridisiert, auch durch selektives Zurückhalten der markierten Probe (z.B. mit Hilfe eines Magneten) isoliert werden.

Die Isolierung und Klonierung homologer Gene durch Kreuzhybridisierung kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, wie sie z. B. in Ausubel et al. (1995, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates, New York) oder Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning) beschrieben sind, erfolgen.

Auf der Basis der isolierten DNA-Sequenz und der dadurch kodierte Proteinsequenz können zudem Oligonukleotide entworfen werden, mit deren Hilfe homologe Nukleinsäuresequenzen mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert werden können.

Eine weitere Möglichkeit zur Isolierung homologer Proteine besteht in der Detektion mit spezifischen Antikörpern gegen das durch die Sequenz der vorliegenden Erfindung kodierte Protein oder Teile davon (z. B. Peptid-Antikörper).

Beschreibung der wichtigsten Sequenzen und Figuren:

SEQ ID No: 1: Nukleotidsequenz der delta-6-Desaturase kodierenden cDNA- der delta-6-Desaturase von *Tetrahymena thermophila*. Start- und Stop- Codon sind hervorgehoben.

SEQ ID No: 2: aus der SEQ ID No.: 1 abgeleitete Proteinsequenz der Tetrahymena delta-6-Desaturase, unter Berücksichtigung des speziellen Ciliaten- Codon-Gebrauchs (Wuitschick JD, Karrer KM (1999), oder CUTG (Codon usage tabulated from Genbank): <http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/CUTG.html>).

SEQ ID No: 3: genomische Nukleotidsequenz der delta-6-Desaturase von *Tetrahymena thermophila*.

Figur 1: Schematische Darstellung der PUFA-Biosynthese.

Figur 2: Ergebnis eines BLASTP - Datenbank - Vergleichs der Proteinsequenz gemäß SEQ ID No.: 2 mit Proteindatenbanken.

Figur 3: Alignment der Proteinsequenz gemäß SEQ ID No.: 2 mit bekannten Desaturasen.

Figur 4: Multiples Alignment der Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID No.: 2 aus tetrahymena mit bekannten Desaturasen. Die Histidin-Boxen sowie das konservierte HPGG-Motiv aus der Cytochrom b5 Domäne sind unterstrichen.

Figur 5: Schematische Darstellung der Genstruktur der delta-6-Desaturase aus Tetrahymena gemäß SEQ ID No.: 1 und 3.

Figur 6: Herstellung des pBDES6 delta-6-Desaturase Expressionskonstruktes.

Figur 7: Herstellung der pgDES6::neo Knockoutkonstrukte.

Figur 8: Vergleich des Fettsäurespektrums (Hauptfettsäuren) der Tetrahymena pBDES6-Transformanten (AX601 und AX604) im Vergleich zum Tetrahymena-Wildstamm (CU522)

BEISPIELE

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung, ohne die Erfindung auf diese Beispiele einzugrenzen.

BEISPIEL 1:

Organismen und Kultivierungsbedingungen

Tetrahymena thermophila (Stämme B1868 VII, B2086 II, B*VI, CU427, CU428, CU522, zur Verfügung gestellt von Dr. J. Gaertig, University of Georgia, Athens, GA, USA) wurden in modifiziertem SPP-Medium (2% Proteosepeptone, 0,1% Hefeextrakt, 0,2% Glucose, 0,003% Fe-EDTA (Gaertig et al. (1994) PNAS 91:4549-4553)) bzw. Magermilchmedium (2% Magermilchpulver, 0,5% Hefeextrakt, 1% Glucose, 0,003% Fe-EDTA) oder MYG-Medium (2% Magermilchpulver, 0,1% Hefeextrakt, 0,2% Glucose, 0,003% Fe-EDTA) mit Zusatz von Antibiotika-Lösung (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphotericin B (SPPA-Medium)) bei 30 °C in 50 ml Volumen in 250 ml Erlenmeyerkolben unter Schütteln (150 U/min) kultiviert.

Plasmide und Phagen wurden in *E. coli* XL1-Blue MRF', TOP10F' oder JM109 vermehrt und selektiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte unter Standardbedingungen in LB- oder NZY-Medium, mit Antibiotika in Standardkonzentrationen (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, New York).

BEISPIEL 2:

Herstellung einer *Tetrahymena thermophila* cDNA-Bibliothek

Gesamt RNA aus *Tetrahymena thermophila* wurde nach der Guanidinthiocyanat/ Phenol/Chloroform Methode isoliert (Chomzynski &

Sacchi (1987) Anal. Biochem. 161: 156-159). Aus der Gesamt-RNA wurde die mRNA mit Hilfe von Oligotex-dT-Kügelchen (Qiagen) isoliert. Die Synthese der cDNA erfolgte nach dem Stratagene ZAP Express cDNA Synthesis and Cloning Kit. Nach Ligation der EcoR I-Adapter und Verdau mit Xho I wurde die DNA über ein Agarosegel aufgetrennt und größenfraktioniert (S: 500 - 1500 bp, B: größer 1500 bp). Die DNA wurde aus dem Gel isoliert (Qiaquick Gel Extraktion Kit, QIAGEN) und in den Eco RI und Xho I geschnittenen ZAP Express Vektor ligiert. Die ligierte DNA wurde in-vitro in Phagen verpackt (Stratagene Gigapack III Gold) und die Phagen wurden in E. coli XL1-Blue MRF' vermehrt. Die S-cDNA-Bank enthielt ca. 5×10^5 Klone mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 1,1 kb, die B-cDNA-Bank enthielt ca. 6×10^4 Klone mit einer durchschnittlichen Insertgröße von 2 kb.

BEISPIEL 3:

RT-PCR mit delta-6-Desaturase spezifischen Primern

Durch Sequenzvergleiche bekannter Desaturasen konnten konservierte Bereiche identifiziert werden. Für die besonders stark konservierten Aminosäurebereiche

WWKWNHNAHH (SEQ ID No.: 4) und GGLQFQIEHHLFP (SEQ ID No.: 5)

wurden unter Berücksichtigung des besonderen Ciliaten-Codon- bzw. *Tetrahymena*-Codon-Gebrauchs PCR-Primer entworfen (Wuitschick JD, Karrer KM (1999) Analysis of genomic G + C content, codon usage, initiator codon context and translation termination sites in *Tetrahymena thermophila*. J. Eukaryot. Microbiol. 46(3):239-47; Martindale (1989) J. Protozool. 36,1: 29-34, CUTG, (Codon Usage Tabulated from Genbank): <http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/CUTG.html>).

Primer 1 (sense): 5'-TGGTGGGAARTGGAMNCAYAA-3', (SEQ ID No.: 6)

Primer 2 (antisense): 5'-CGDGGRAANARRTGRTGTTC-3' (SEQ ID No.: 7).

100 ng isolierte mRNA wurde für die Erststrangsynthese mit AMV-Reverser Transkriptase (Boehringer Mannheim) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte nach dem Hersteller-Protokoll in 20 µl Volumen: 50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM dNTPs, 2 pmol Oligo-dT-Ankerprimer (5'- GACCACGCGTATCGATGTCGACT(16)V-3'; SEQ ID NO.: 8), 2 units AMV-Reverse Transkriptase, 60 min. bei 55 °C, anschließend 10 min 65 °C. 1/10 dieser Erststrangreaktion wurde für die PCR eingesetzt. Die PCR erfolgte in 25 µl Volumen mit: 1 x Qiagen HotStarTaq PCR-Puffer (QIAGEN), pH 8,7 (20 °C), je 10 pmol der delta-6-Desaturase spezifischen Primer, je 200 µM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1 unit HotStarTaq-Polymerase (Qiagen). Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Anfangsdenaturierung bei 95 °C für 15 min, anschließend folgten 35 Zyklen mit jeweils 94 °C für 30 sec, 45 °C für 30 sec und 72 °C für 1 min. Abschließend 10 min 72 °C. Die PCR-Fragmente wurden durch T/A Klonierung (Invitrogen) in den Vektor pCR 2.1 ligiert und in E. coli TOP10F' (Invitrogen) vermehrt. Von positiven Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert (Qiaprep Spin, QIAGEN) und sequenziert.

BEISPIEL 4:

Isolierung der vollständigen delta-6-Desaturase kodierenden cDNA

Auf der Basis der so ermittelten Sequenz wurden neue Oligonukleotide für die PCR entworfen:

Primer d6/1-F (sense): 5'- GGAATCACAATCAACATCATATGTTTCAC -3' (SEQ ID No.: 9) und

Primer d6/1-R (antisense): 5'- CTTCGTCCTTTAGAATGTTGTTTGTGAAC -3' (SEQ ID No.: 10).

Die Isolierung der vollständigen delta-6-Desaturase kodierenden cDNA erfolgte durch PCR mit diesen Primern in Kombination mit Vektor-

spezifischen Primern (T3 und T7) aus der cDNA-Bank. Von der cDNA-Bank wurden 2 µl (10⁵ pfu/µl) für eine PCR (s.o) eingesetzt. Die PCR erfolgte abweichend von den oben angegebenen Bedingungen nach folgendem Protokoll: 15 min 95 °C Denaturierung, anschließend 35 Zyklen mit 20 sec. 94 °C, 20 sec 57 °C, 1 min. 72 °C. Abschließend 10 min 72 °C. Die PCR-Produkte wurden mit den auch für die PCR eingesetzten Primern sequenziert. Auf der Basis der so gewonnenen Sequenzinformationen wurde ein neuer Primer entworfen, der am 5'-Ende der cDNA-Sequenz lag:

Primer d6-5'-F: AGTAAGCAAACCTAAATTTAAAAACAAGC (SEQ ID NO.: 11)

Mit Hilfe dieses Primers in Verbindung mit einem vektorspezifischen Primer konnte die vollständige cDNA-Sequenz durch PCR (PCR-Bedingungen s.o.) amplifiziert und isoliert werden. Durch die Klonierung dieses PCR-Produktes in den Vektor pCR 2.1 erhielt man das Plasmid pDES6.

BEISPIEL 5:

Herstellung einer *Tetrahymena thermophila* genomischen DNA-Bibliothek

Genomische DNA wurde mit Hilfe der Harnstoff-Methode (Gaertig et al. 1994) aus *Tetrahymena* isoliert und mit Eco R I geschnitten. Die geschnittene DNA wurde in einen ebenfalls Eco R I geschnittenen Lambda-Vektor (Zap Express, Stratagene) ligiert. Die weitere Durchführung entsprach der Vorgehensweise bei der cDNA-Bibliothek.

BEISPIEL 6:

Isolierung der genomischen Sequenz der delta-6-Desaturase

Die genomische Sequenz der delta-6-Desaturase wurde mit Hilfe der PCR ermittelt. Zum einen wurde mit Primern vom 5'- und 3'-Ende der cDNA:

d6-5'-F: AGTAAGCAAACCTAAATTTAAAAACAAGC (SEQ ID No.: 12)
d6-3'-R: GGTCCTTCATGAATCTTAAGGTTCCACTTC (SEQ ID No.: 13)
aus genomischer DNA ein ca. 2200 bp großes PCR-Produkt erzeugt,
welches die gesamte kodierende Sequenz und Introns enthielt. Um
flankierende Sequenzen des delta-6-Desaturase Gens zu isolieren wurde
das Genome Walker System (Clontech) benutzt. Mit Hilfe der
universellen Primer aus diesem System und spezifischen Primern auf der
Basis der ermittelten delta-6-Desaturase Sequenz
d6-5'-R: CTTAAGTCTTATCAACTCCCATAATGC (SEQ ID No.: 14)
d6-3'-F: GAAGTGGAACCTTAAGATTCATGAAGGACC (SEQ ID No.: 15)
konnten flankierende Bereiche des delta-6-Desaturase Gens aus
Tetrahymena isoliert werden. Die vollständige Struktur der genomischen
Sequenz ist in Figur 5 dargestellt.

BEISPIEL 7:

Herstellung der Expressionskonstrukte pBDES6

Der Vektor pBICH3 (Gaertig et al. 1999 Nature Biotech. 17: 462-465)
enthält die kodierende Sequenz des *Ichthyophthirius* I-Antigen (G1)
Präprotein flankiert von den nicht kodierenden, regulativen Sequenzen
des *Tetrahymena thermophila* BTU1-Gens. Ein modifiziertes Plasmid
(pBICH3-Nsi) mit einer Nsi I Schnittstelle am Start (zur Verfügung gestellt
von J. Gaertig, University of Georgia, Athens, GA, USA) wurde benutzt,
um das delta-6-Desaturase Expressionskonstrukt pBDES6 herzustellen.
Dazu wurden mittels PCR Nsi I und Bam HI Schnittstellen am Start und
Stop der kodierenden Sequenzen der delta-6-Desaturase von
Tetrahymena eingefügt. Für die PCR wurden isolierte Plasmide, welche
die vollständigen cDNA-Sequenzen der delta-6-Desaturase enthalten
(pDES6) als Template eingesetzt. Die Primer
D6-Nsi-F: 5'-GCATTATGCATGTTGATAAGACTTAAGAAG-3' (SEQ ID
No.: 16)

D6-Bam-R: 5'-TATGGATCCTCAAAGGTGAGATTTTTCAAAAATAG-3'
(SEQ ID No.: 17)

erzeugten PCR-Produkte, welche die vollständige kodierende Sequenz der delta-6-Desaturase, flankiert von Nsi I und Bam HI Schnittstellen, enthielten. Die PCR-Produkte und das Plasmid pBICH3-Nsi wurden mit den Restriktionsenzymen Nsi I und Bam HI geschnitten, über ein Agarosegel gereinigt und ligiert (s. Abb. Plasmidkonstruktion). Die so entstandenen Expressionskonstrukte pBDES6 enthielten die vollständige delta-6-Desaturase kodierende Sequenz inseriert in einem korrekten Leseraster in die regulatorischen Sequenzen des BTU1 Gens (siehe Figur 6). Für die Transformation von Tetrahymena wurden die Konstrukte durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen Xba I und Sal I linearisiert. Bei einer erfolgreichen Transformation wurde durch homologe Rekombination das BTU1-Gen durch diese Konstrukte ersetzt, wodurch eine Resistenz der Zellen gegenüber Paclitaxel vermittelt wurde.

BEISPIEL 8:

Bestimmung des Fettsäurespektrums der Transformanten

Die Bestimmung des Fettsäurespektrums erfolgte mittels Gaschromatographen (HP GC 6890) mit Flammenionisationsdetektor (Hewlett-Packard Company, Wilmington, USA). Als Säule diente eine FFAP (Free Fatty Acid Phase) Permbond (Macherey & Nagel GmbH, Düren). Die Identifizierung der Fettsäuren erfolgte durch den Vergleich mit Retentionszeiten von Fettsäuremethylester-Standards. Auf der Basis der bekannten Konzentration des Standards konnte die Konzentration der Fettsäuren in den Proben bestimmt werden.

Zur Bestimmung des Fettsäurespektrums wurden die isolierten Transformanten in MYG-Medium bei 30 °C, 150 RPM für 24-96 h kultiviert. 50 ml der Kultur wurden bei 1500 g für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet bei -80 °C eingefroren und anschliessend

gefriergetrocknet. 50 mg der lyophilisierten Probe wurden eingewogen und mit 1 ml 20%iger methanolischer HCl und 1 ml methanolischer Standard-Lösung (1 mg/ml) versetzt. Zur Freisetzung der Fettsäuren und deren Umesterung in Fettsäuremethylester wurden die Proben im geschlossenen Reagenzglas zwei Stunden bei 60°C im Wasserbad gerührt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Zum Neutralisieren der Probe wurde anschließend 1 ml wässrige, gesättigte Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Durch Zugabe von n-Hexan wurden die Fettsäuremethylester extrahiert. Anschließend wurde der Ansatz kräftig durchmischt und durch Zentrifugation für 2 min. bei 4300 rpm eine Phasentrennung erreicht. Etwa 2/3 der oberen, organischen Phase wurden entnommen und 1 µl der Probe wurde auf die GC-Säule gespritzt und analysiert.

Tab lle 1:

GLA-Gehalt der Tetrahymena pBDES6-Transformanten (AX601 und AX604) im Vergleich zumTetrahymena-Wildstamm (CU522) nach 50 h Kultivierung. Angegeben ist der prozentuale Anteil der GLA am Gesamtfettsäurespektrum sowie die prozentuale Differenz der Transformanten im Vergleich zum nicht-transformierten Tetrahymena Stamm CU522.

Stamm (Plasmid)	GLA-Area %	Differenz zu CU522
CU522 (-)	24,0	-
AX601 (pBDES6)	31,7	+ 32%
AX604 (pBDES6)	29,3	+ 22%

Tabelle 2:

Vergleich des Fettsäurespektrums (Hauptfettsäuren) der Tetrahymena pBDES6-Transformanten(AX601 und AX604) im Vergleich zumTetrahymena-Wildstamm (CU522) nach 50 h Kultivierung. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Hauptfettsäuren am gesamt Fettsäurespektrum, sowie das Verhältniss der ungesättigten zu den gesättigten Hauptfettsäuren.

Fettsäuren	Cu522 (-)	AX601 (pBDES6)	AX604 (pBDES6)
C14:0	9,4	7,2	7,4
C14:1	2,8	3,5	3,1
C16:0	12,7	7,3	7,2
C16:1	4,5	6,4	6
C18:0	2,6	-	1,4
C18:1	9,5	3,9	4,8
C18:2	9,4	11,5	10,6
GLA (C18:3)	24	31,7	29,3
ungesättigt	50,2	57	53,8
gesättigt	24,7	14,5	16
ungesättigt/ gesättigt	2,03	3,93	3,36

Die Transformanten zeigten unter diesen Bedingungen einen um 22-32% erhöhten Anteil von GLA am Gesamtfettsäurespektrum gegenüber dem nicht-transformierten Stamm CU522 (Tabelle 1). Neben der Verschiebung des GLA-Anteils ist eine deutliche Verschiebung des Fettsäurespektrums zu einem höheren Gehalt an ungesättigten Fettsäuren auffällig. Das Verhältniss der ungesättigten zu den gesättigten (Haupt)Fettsäuren ist bei den Transformanten nahezu doppelt so hoch (Tabelle 2).

BEISPIEL 9:

Herstellung des delta-6-Desaturase Knock-out Konstruktes pgDES6::neo

Für die Herstellung des Knock-out Konstruktes wurde in die genomische Sequenz der delta-6-Desaturase eine neo-Kassette aus dem Plasmid p4T2-1 Δ H3 (Gaertig et al. (1994) Nucl. Acids Res. 22:5391-5398) inseriert. Dabei handelt es sich um das Neomycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des Tetrahymena Histon H4-Promoters und der 3' flankierenden Sequenz des BTU2 Gens. Dieses Konstrukt vermittelt in Tetrahymena eine Resistenz gegenüber Paromomycin. Das Plasmid p4T2-1 Δ H3 wurde mit Eco RV / Sma I geschnitten und das ca. 1,4 kb grosse Fragment der neo-Kassette wurde in das mit Eco RV geschnittene Plasmid pgDES6 in die genomische Sequenz der Tetrahymena delta-6-Desaturase ligiert (siehe Figur 8). Dadurch wurde das Plasmid pgDES6::neo erzeugt. Bei einer erfolgreichen Transformation wurde durch homologe Rekombination das Gen für die delta-6-Desaturase durch dieses Konstrukt ersetzt, wodurch eine Resistenz der Zellen gegenüber Paromomycin vermittelt wurde.

BEISPIEL 10:

Macronucleus-Transformation von Tetrahymena mit dem Desaturase Expressionskonstrukt pBDES6

Für eine Transformation wurden 5×10^6 *Tetrahymena thermophila* Zellen (CU522) eingesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 50 ml SPPA-Medium bei 30 °C in einem 250 ml Erlenmeyerkolben auf einem Schüttler bei 150 RPM bis zu einer Zelldichte von ca. $3-5 \times 10^5$ Zellen/ml. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1200 g) für 5 min pelletiert und das Zellpellet wurde in 50 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert und wie vorher zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt und die Zellen in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5, plus Antibiotika) bei einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml resuspendiert, in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und für 16-20 h ohne Schütteln bei 30 °C inkubiert (Hungerphase). Nach der Hungerphase wurde erneut die Zellzahl bestimmt, wie oben zentrifugiert und die Zellen mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Ein ml der Zellen wurde für die Transformation benutzt. Die Transformation erfolgte mittels Mikropartikelbeschuss (s.u.). Zur Regeneration wurden die Zellen in SSPA-Medium aufgenommen und bei 30 °C ohne Schütteln im Erlenmeyerkolben inkubiert. Nach 3 h wurde Paclitaxel® in einer Endkonzentration von 20 µM zugegeben und die Zellen in Aliquots von 100 µl auf 96er Mikrotiterplatten überführt. Die Zellen wurden in einer feuchten, abgedunkelten Box bei 30 C inkubiert. Nach 2-3 Tagen konnten Paclitaxel resistente Klone identifiziert werden. Positive Klone wurden in frisches Medium mit 25 µM Paclitaxel überimpft. Durch Kultivierung der Zellen in steigender Paclitaxel-Konzentration (bis 80 µM) wurde ein komplettes "phenotypic assortment" (Gaertig & Kapler (1999)) erreicht.

Zur Analyse der Klone wurden ca. 4 ml Kulturen in SPPA mit Paclitaxel angezogen, DNA isoliert (Jacek Gaertig et al. (1994) PNAS 91:4549-4553) und durch PCR die in den BTU1-Locus integrierte DNA amplifiziert. Als Primer dienten die BTU1 spezifischen Primer BTU1-5'F (AAAAATAAAAAAGTTTGAAAAAAAACCTTC, ca 50 bp vor dem Startcodon, SEQ ID No.: 18) und BTU1-3'R

(GTTTAGCTGACCGATTCAAGTTC, 3 bp hinter dem Stopcodon, SEQ ID No.: 19). Die PCR-Produkte wurden ungeschnitten und mit Hind III oder Eco RV (pBDES6) bzw. Eco RI (pBDES9) geschnitten auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Vollständiges "phenotypic assortment" wurde über RT-PCR mit den BTU1 spezifischen Primern (Gaertig & Kapler (1999)) überprüft.

BEISPIEL 11:

Micronucleus- und Macronucleus-Transformation von Tetrahymena mit dem Knock-out Konstrukt pgDES6::neo

Tetrahymena Stämme unterschiedlichen Paarungstyps (CU428 VII und B2086 II) wurden getrennt in SPPA-Medium bei 30 °C unter Schütteln (150 Upm) in einem Erlenmeyerkolben kultiviert. Bei einer Zelldichte von $3-5 \times 10^5$ Zellen/ml wurden die Zellen 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (1200 g). Die Zellen wurden dreimal mit 50 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen und schließlich in 50 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert und mit Antibiotika-Lösung versetzt. Die Zellen wurden in einem Erlenmeyerkolben bei 30 °C ohne Schütteln inkubiert. Nach ca. 4 h wurden beide Kulturen erneut gezählt und mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) auf 3×10^5 Zellen/ml verdünnt für weitere 16-20 h bei 30 °C inkubiert. Nach dieser Hungerphase wurde von beiden Kulturen die gleiche (absolute) Zellzahl in einem 2-L Erlenmeyerkolben gemischt. Die Zellen wurden bei 30 °C inkubiert (Beginn der Konjugation) und nach 2 h wurde die Effizienz der Konjugation bestimmt. Für eine erfolgreiche Transformation sollten zu diesem Zeitpunkt ca. 30% der Zellen als Paare vorliegen.

Für die Micronucleus-Transformation wurden 3 h, 3,5 h, 4 h und 4,5 h nach Beginn der Konjugation jeweils 1×10^7 konjugierende Zellen (5×10^6

Paare) 5 min bei 1200 g zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) resuspendiert.

Für die Transformation der neuen Macronucleus-Anlagen wurden 11 h nach Beginn der Konjugation Zellen wie oben zentrifugiert und in Tris-HCl resuspendiert. Die Transformation erfolgte mittels Mikropartikelbeschuss (s.u.).

Für die Kultivierung der delta-6-Desaturase Knockout-Mutanten wurde 200 µg/ml Borage-Öl (20-25% GLA; SIGMA) zum Medium zugegeben.

Durch Selektion auf Paromomycinresistenz konnten transformierte Zellen identifiziert werden. Bei der Transformation des Mikronucleus wurde 11 h nach Beginn der Konjugation Paromomycin (100 µg/ml Endkonzentration) zugegeben und die Zellen in Aliquots von 100 µl auf 96er Mikrotiterplatten verteilt. Die Zellen wurden in einer feuchten Box bei 30 °C inkubiert. Nach 2-3 Tagen konnten resistente Klone identifiziert werden. Echte Mikronucleus-Transformanten konnten anhand der Resistenz gegenüber 6-Methylpurin von Macronucleus-Transformanten unterschieden werden. Bei der Transformation des Macronucleus wurde ca. 4 h nach der Transformation Paromomycin (100 µg/ml Endkonzentration) zugegeben und die Zellen in Aliquots von 100 µl auf 96er Mikrotiterplatten verteilt. Die Zellen wurden in einer feuchten Box bei 30 °C inkubiert. Nach 2-3 Tagen konnten resistente Klone identifiziert werden. Positive Klone wurden in frisches Medium mit 120 µg/ml Paromomycin überimpft. Durch Kultivierung der Zellen in dieser hohen Paromomycin-Konzentration wurde nach einigen Generationen ein komplettes "phenotypic assortment" (Gaertig & Kapler (1999)) erreicht.

Durch Kreuzung der Micronucleus-Transformanten mit einem B*VI-Stamm konnten homozygote Knockout-Mutanten erzeugt werden (Bruns & Cassidy-Hanley, Methods in Cell Biology, Volume 62 (1999) 229-240).

BEISPIEL 12:

Biolistische Transformation (Mikropartikelbeschuss)

Die Transformation von *Tetrahymena thermophila* erfolgte mittels biolistischer Transformation, wie sie bei Bruns & Cassidy-Hanley (Methods in Cell Biology, Volume 62 (1999) 501-512); Gaertig et al. (1999) Nature Biotech. 17: 462-465) oder Cassidy-Hanley et al. ((1997) Genetics 146:135-147) beschrieben ist. Die Handhabung des Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery System (BIO-RAD) ist detailliert im zugehörigen Handbuch beschrieben.

Für die Transformation werden 6 mg Goldpartikel (0,6 µm; BIO-RAD) mit 10 µg linearisierter Plasmid DNA beladen (Sanford et al. (1991) Biotechniques 3:3-16; Bruns & Cassidy-Hanley (1999) Methods in Cell Biology, Volume 62: 501-512).

Vorbereitung der Goldpartikel: 60 mg der 0,6 µm Goldpartikel (Biorad) wurden in 1 ml Ethanol resuspendiert. Dazu wurden die Partikel 3 mal für je 1-2 min auf einem Vortex kräftig gemixt. Anschliessend wurden die Partikel für 1 min zentrifugiert (10000 g) und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Die Goldpartikel wurden in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt, die Partikel in 1 ml 50%igem Glycerol resuspendiert und in Aliquots zu 100 µl bei -20 °C gelagert.

Vorbereiten der Transformation: Die Macrocarrierhalter, Macrocarrier und Stopscreens wurden für mehrere Stunden in 100% Ethanol, die Rupture Disks in Isopropanol gelagert. Ein Macrocarrier wurde anschließend in den Macrocarrier-Halter eingesetzt und an der Luft getrocknet.

Beladung der Goldpartikel mit DNA: Alle Arbeiten erfolgten bei 4 °C. Goldpartikel, vorbereiteter Vektor, 2,5 M CaCl₂, 1 M Spermidine, 70% und 100% Ethanol wurden auf Eis gekühlt. 10 µl der linearisierten Vektor-DNA

(1 µg/ml) wurden zu 100 µl vorbereiteten Goldpartikeln gegeben und für 10 sec vorsichtig gevortext. Anschliessend wurden erst 100 µl 2,5 M CaCl_2 zugegeben, 10 sec gevortext und dann 40 µl 1 M Spermidine zugegeben und 10 min vorsichtig gevortext. Nach Zugabe von 200 µl 70%igem Ethanol wurden die Partikel für 1 min gevortext und dann 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 µl 100%igem Ethanol resuspendiert, zentrifugiert und dann in 35 µl 100%igem Ethanol resuspendiert.

Die so vorbereiteten Partikel wurden vorsichtig mit einer Pipette auf das Zentrum eines Macrocarriers gegeben. Der Macrocarrier wurde anschliessend bis zur Transformation in einer Box mit hygroskopischen Silicagel gelagert.

Transformation: Ein ml der vorbereiteten Zellen (siehe oben) wurde in die Mitte eines mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) angefeuchteten Rundfilters in einer Petrischale gegeben und in die unterste Einschubleiste der Transformationskammer des Biolistic® PDS-1000/He Particle Delivery Systems eingesetzt. Die Transformation erfolgte mit den vorbereiteten Goldpartikeln bei einem Druck von 900 psi (zwei 450 psi Rupture Disks) und einem Vacuum von 27 inches Hg in der Transformationskammer. Anschliessend wurden die Zellen sofort in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml SPPA-Medium überführt und bei 30 °C ohne Schütteln inkubiert.

Patentansprüche:

1. Nukleinsäure kodierend für delta-6-Desaturase aus *Tetrahymena* mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No.: 2 oder ein funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ ID No.: 1 Teil des Anspruchs ist.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure aus einem Ciliaten erhalten wird.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure aus *Tetrahymena thermophila* erhalten wird.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA oder RNA, vorzugsweise eine doppelsträngige DNA, ist.
5. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine DNA mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID No.: 1 von Position 33 bis Position 1091 ist.
6. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure eine oder mehrere nicht kodierende Sequenzen enthält.
7. Eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 6 gemäß SEQ ID No.: 3 oder ein funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 8 Nukleotiden, wobei SEQ ID No.: 3 Teil des Anspruchs ist.

8. Nukleinsäuren nach einem der Ansprüche 1 – 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor, enthalten ist.
9. Expressionvektoren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure in funktioneller Kombination zu einem konstitutiven und / oder induzierbaren Promoter und optional einem Terminationssignal steht.
10. Verfahren zur Herstellung einer Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure chemisch synthetisiert oder anhand einer Sonde aus einer Genbank isoliert wird.
11. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 2 oder eine funktionelle Variante davon, und Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren.
12. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 1-7 in einem geeigneten Expressionssystem oder Wirtsorganismus exprimiert wird.
13. Antikörper gegen ein Polypeptid gemäß Anspruch 11.
14. Transgener Organismus enthaltend eine Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 10.
15. Transgener Organismus nach Anspruch 11 ausgewählt aus Pflanze oder Ciliaten.

16. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß der Ansprüche 1-7 und/oder Polypeptide gemäß Anspruch 11 zur Anreicherung von delta 6 Desaturase abhängigen Fettsäuren in Ciliaten.



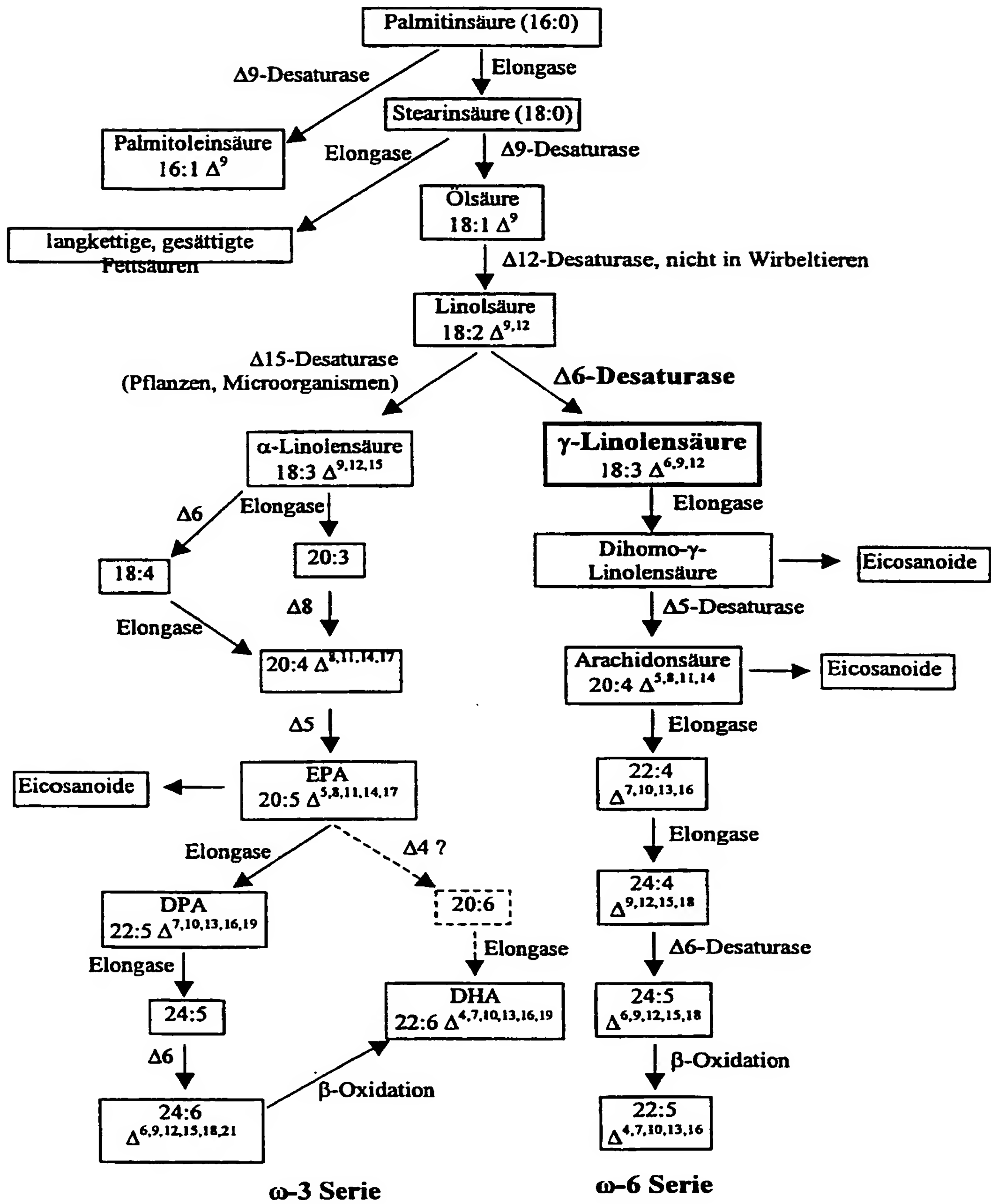
.

.

.

.

Fig. 1



BLASTP 2.0.0 (Jan-05-1999)
References: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui
5 Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-
BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res.
25:3389-3402.

Query= T.thermophila, delta-6-Desaturase (352 letters)

Database: /LION/data/db/fast/nrdb

387,705 sequences; 119,829,732 total letters

		Score	E
		(bits)	Value
15	s quences producing significant alignments:		
	trembl AF078796 AF078796_1 gene: "des-5"; product: "delta 5 fat...	79	4e-14
	trembl AF031477 AF031477_1 product: "delta6-fatty-acid-desatura...	79	4e-14
	trembl Z81122 CET13F2_1 gene: "T13F2.1"; Caenorhabditis elegan...	78	1e-13
20	trembl Z70271 CEW08D2_2 gene: "W08D2.4"; Caenorhabditis elegan...	78	1e-13
	trembl AF005096 AF005096_1 product: "desaturase/cytochrome b5 p...	70	3e-11
	trembl AJ222980 PPAJ2980_1 gene: "des6"; product: "delta6-acyl-...	69	6e-11
	trembl U79010 BOU79010_1 product: "delta 6 desaturase"; Borago...	67	2e-10
	trembl AC005397 AC005397_14 gene: "T3F17.14"; product: "putativ...	67	2e-10
25	trembl AF007561 AF007561_1 product: "delta 6-desaturase"; Bora...	66	4e-10
	tremblnew AF126799 AF126799_1 product: "delta-6 fatty acid desa...	64	2e-09
	tremblnew AF126798 AF126798_1 product: "delta-6 fatty acid desa...	63	3e-09

2/10

Fig. 2

	trembl AF031194 AF031194_1 gene: "S276"; product: "S276"; Trit...	62	6e-09
	tremblnew AB021980 AB021980_1 product: "delta-6 fatty acid desa...	62	6e-09
30	tremblnew AL078610 SCH35_12 gene: "SCH35.42c"; product: "putati...	62	8e-09
	trembl AJ224160 BNAJ4160_1 gene: "sld1"; product: "delta-8 sphi...	60	2e-08
	trembl AC004770 AC004770_2 product: "BC269730_2"; Homo sapiens...	60	3e-08
	trembl AJ224161 ATAJ4161_1 gene: "sld1"; product: "delta-8 sphi...	59	6e-08
	tremblnew AL050118 HSM800210_1 gene: "DKFZp586C201"; product: "...	57	2e-07
35	trembl AB022097 AB022097_1 product: "delta 5 fatty acid desatur...	57	2e-07
	trembl X87143 HACYTB5RN_1 product: "cytochrome b5 containing fu...	50	2e-05
	trembl Y08460 MMDES_1 gene: "Mdes"; product: "Mdes protein"; ...	50	3e-05
	trembl AF001394 AF001394_1 product: "fatty acid desaturase/cyto...	46	4e-04
	trembl AF002668 HSAF2668_1 product: "MLD"; Homo sapiens putati...	46	5e-04
40	swiss Q08871 LLCD_SYNY3 LINOLEOYL-COA DESATURASE (EC 1.14.99.25...	43	0.003

F rtsetzung Fig. 2

3/10
Fig 3A

>aageneseq|W95504|N95504 Norttierella alpina delta 6 desaturase. Length = 457

5 Score = 89.7 bits (219), Expect = 4e-18
 Identities = 102/422 (24%), Positives = 152/422 (35%), Gaps = 88/422 (20%)

10 Query: 9 EIVLENEPELLNEKFIYKDTYDCTEYAKSNKHPGGLNFLHLFIDFKQDLTEYFRTLHS 68
 E + E K + + I + YD E+ HPGG L +D T+ F T H
 Sbjct: 19 EALNEGKKDAEAPFLMIIDNKVYDVEFVDP--HPGGSVILT---HVGKDGTDVEDTEHR 73

15 Query: 69 KOALKILKSFPKGTAKQEETZ--SKRFSILKKLKLHLPFNWPIEIG----LFLTFTFLF 123
 + A + L +F + + + + F+ +KL+ LF+ + F +F L
 Sbjct: 74 EAAWETLANFYVGIDESDRDIKDDFAAEVRKLRTLFQSLGYDSSKAYAFKVSFNLC 133

20 Query: 124 VTGCLT---QKW-----YFSIPLLVLMQIISGWIHSHNHNRPILR-----KFAIVY 168
 + G T KW S LL L GN+ H H++ R F
 Sbjct: 134 INGLSTVIVAKWGQTSTLANVLSAALLGLTWQCCGNLAHDFLHGVFQDRFWGDLFGAFL 193

25 Query: 169 APLCGGFSNKNWGRKHQHMTNHLKDEDIQ-HDYKLNQ-----ASYFEFEGIFLALHMV 238
 +C GFS+ NW KKH HH N +D DI H W E + LA+HW
 Sbjct: 194 GGVCQGFSSWNKDKHNTTHAAPNVHGEDPDIDTHPLTWSEHALEMFSVDPDEELTRMW 253

30 Query: 209 -----FP---FLFLKWLDSIL-----FP F L W L SIL E + LA+HW
 FP F L W L SIL
 Sbjct: 254 SRENVLNQTNFYFPILSFARLSNCLQSILFVLPNGOAHKPSGARVPISLVEQLSLAMHMT 313

35 Query: 239 LLENQNFYIV-----ILSELIAGFFSASILLVGNHN--EMKFERRITLPFTEHQI 286
 F + ++S+ + G A + NH + E + + FF QI
 Sbjct: 314 WYLATNLFIKDPVNLVYFLVSQAVCGHLLAIVFSLNHNGMPVISKEEAVDMDFTTKQI 373

 Query: 287 AASRWYAFHDIFSLINGGMQYQTEHHFTFPQIPFYRLPKARVIAEELKKNLKIHEGPI 346
 R+ +F+ GG+ YQ EHH FP +P + K + + KK+N++ H +
 Sbjct: 374 ITGRD-VHPLGANFTTGLNYYQIEHHLFSPNPHNTFSKIQPAVETLCKKNVRYHTTGM 432

 Query: 347 FE 348
 E
 Sbjct: 433 IE 434

Fig. 3B

>trembl|AF031477|AF031477.1 product: "delta6-fatty-acid-desaturase";
Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase mRNA, complete cds. //:gp|AF031477|3088520
product: "delta6-fatty-acid-desaturase"; Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase
mRNA, complete cds. Length = 443

Score = 79.2 bits (192), Expect = 4e-14
Identities = 100/390 (25%), Positives = 132/390 (33%), Gaps = 95/390 (24%)

Query: 41 KHPGGLNLFNLFIDEKQDLTEYFRTLH--SKQALKILKSPFKTGAQZ--ETESSKR--- 93
KHPGG D T F R S Q A K L K G E E + KR
Sbjct: 28 KHPGGAVIEQY---RNSDATHIFAFHEGSSQAYKQDLKKKHGEHDEFLEKQLEKRLDX 84

Query: 94 -----FSILKKLKH--LFEPNWPIBIGLFTTFTLFTVGTCLTQ 130
F L+KL L + N + ++T ++ Q
Sbjct: 85 VDINVSAYDVSVAQEKKMVESFEKLRQKLHDDGLMKANETYFLKAI STL SIMAFAYLQ 144

Query: 131 K--WYF-SIPLLVLMQIISGIGHSMNHR-----NPILKFAVYAPLCGGFSNKNWGRK 183
WY S LL L GN+ H H + P+ +L + GFS NW K
Sbjct: 145 YLGNYITSACLLALANQCFGLTHEFCHQOFTKRNPLNDTISLFFGNFLQGGFSRDWWDK 204

Query: 184 HNQHMTNINLKEDI-----QHDYKLWQFFELF 213
HN HH TN I D DI OH Y P L
Sbjct: 205 HNTTHAATNVIDHGDIDLAPLFAFIPGDLCKYKASF EKAILKIVPYQHLYFTAMLPLR 264

Query: 214 LKWKLSILASYE-----FEGIFLALHNVLLFNQFYI-----VILS 251
W S+ + E +E + HW +F Q F + I+S
Sbjct: 265 FSWTGQSVQNVFKENQMEYKVYQRNAFWEQATIVGHWANVFYQLFLPTNPLRVAYFIIS 324

Query: 252 ELIAGFFSASILVGNHENENKE--ERRITLPFFEHQIAASRNYYAFHDIFSLLIMGNQYQ 309
++ G A ++ NH + K+ RI F QI +RN L GG+ YQ
Sbjct: 325 QMGGGLLIAHVVTNHNNSVDKYPANSRILNNFAALQILTRNMTSPFIDWL-WGGLNYQ 383

Query: 310 TEHFFFPQIPFYRLPKARVIAEELKKNL 339
EHH FP +P L + E K+ NL
Sbjct: 384 IEHHLFPTMPRCNLNACVKYKWCCKENL 413

Fig. 3C

>trembl|U79010|B0079010.1 product: "delta 6 desaturase"; Borago officinalis delta 6 desaturase mRNA, complete cds. 7/:gp|U79010|2062403 product: "delta 6 desaturase"; Borago officinalis delta 6 desaturase mRNA, complete cds. Length = 440

Score = 67.1 bits (161), Expect = 2e-10
Identities = 100/414 (24%), Positives = 154/414 (37%), Gaps = 100/414 (24%)

10 Query: 6 TQEEIVLENKPELLNEYKFIYKDYCTEYAKSNKHPGGLNFTLNLFIDEXQDLTEYFRT 65
T +E+ +EP + + YD +++ K HPGG L Q++T+ F
Sbjct: 10 TSDELKKNHDKP---GDLWISIQKAYDVSDWVKD--HFGGSFPLKSLAG--QEVTDAFVA 62

15 Query: 66 LHSKQALKILKSFPRTGAKQEE---TESSK-----RFSILKKLKLHFEPNWPIE 112
H K L F TG ++ +E SK + + KK +F I
Sbjct: 63 FHPASTWKNLDRF-FTGYLYLKDYSVSEVSKDYRKLVTEFSKNGLYDKKGHIMFATLCFIA 121

20 Query: 113 IGLFLTTF-TLFTVGTCLTQKWYSIPLLVLNQIISGNIGHSMNHR---NPILRKFALVY 168
+ ++ + LF G L FS L+ + I SGWIGH H + L KF ++
Sbjct: 122 MLFAMSVYGVLFCEGVLVH--LFSGCLAGFLNIQSGNIGHDAGHYMVVSDSRLKFGIF 179

25 Query: 169 APLC-GGFSNKNWGRKHNQHMTNNILKDEDIQH----- 202
A C G S NW HN HH+ N++ D D+Q+
Sbjct: 180 AANCLSGISIGNWKNWNAHHAHIACNSLEYDPDLQYIPFLVSSKFFGSLTSHFYEKRLTF 239

30 Query: 203 -----DYKLNQFPFLELKWKLDSILASY-----YEFEGIFLALHWVLL- 240
Y+ W F + +L+ + S +E G + W L
Sbjct: 240 DSLSRFFVSYQHWTFYPINCAARLNNYVOSLIMLTNRNVSYRAHELLGCLVFSIHWYPLL 299

35 Query: 241 -----FNQNFYIVILSELIAGF-----FSASILVGNHENEKFFERRITLPFFEHQ 285
+ + VI S + G FS+S+ VG + FE++ T +
Sbjct: 300 VSCLPNWGERIMFVIASLSVTGMQQVQFSLNHFSSSVYVGRPKGNWFEKQ-TDGTLDIS 358

Query: 286 IAASRNAYAFHDIFSLLIMGMQYQTEHHFFQIPFYRLPKARVIAEELKKWNL 339
++ FH GG+Q+Q EHH FP++P L K + E KR NL
Sbjct: 359 CPPWMDW-FH-----GGLOFQIEHHLFPKMPRCNLKISPYVIELCKKHNL 403

Fig 3D

40 >tremblnew/AF126799|AF126799_1 product: "delta-6 fatty acid desaturase"; Homo sapiens delta-6 fatty acid desaturase mRNA, complete cds. //:gp|AF126799|406528 product: "delta-6 fatty acid desaturase"; Homo sapiens delta-6 fatty acid desaturase mRNA, complete cds. length = 444

45 Score = 63.6 bits (152), Expect = 2e-09
 Identities = 92/390 (23%), Positives = 152/390 (39%), Gaps = 88/390 (22%)

50 Query: 31 YDCTEYAKSHKHPGGLNVLNLFIDKQDLTEYFRTLHKOAL--KILK-----SFPKPGA 83
 Y+ T++ S +HPGG + + E D T+ FR H K LK
 Sbjct: 44 YNITKN--SIQHPGGQRVIGHYAGE--DATDAFRAFPDLEFVGKFLKPLLIGELAPEEP 99

55 Query: 84 KOETESSK---RFSILKKKLK--HLFZPNWPIEIGLF-----LTFTLFTVTCCLTQ 130
 Q+ ++SK F L+K + +LF+ H + L + FT+P G
 Sbjct: 100 SQDRGKWSKITEDFRALRKTAEDGNLFTKTHVFFLLLAHIIALESIAWFTVYFGNGWI 159

60 Query: 131 KNYFSIPLLVLNQIISGWIGHSPNH-----NRNPILRKVALVYAPLCGGFSNKWNGRK 183
 + +L Q +GW+ H H H ++ KF + + G S NW +
 Sbjct: 160 PTLITAFVLATSOAQAGWLQHDYGLSVYRKPKWHLVHKFVIGHLK---GASANWNNHR 216

65 Query: 184 HNOHMFNTNLIKDEDIQ--HDYKL--NQPPFLFLANKL-----DSIL 222
 H QHK N KD D+ H + L NQ P + K KL ++
 Sbjct: 217 HFQHHAKPNIFHKDPDVNMLHVTVLGENQ-PIEYGGKKLKYLPYNHQHEYFFLIGPPLLI 275

70 Query: 223 ASYYEFGI-----FLAHNVLLFNQNFYIV-----ILSELIAGFFSASILVGNH- 267
 Y++++ I ++ L N + + F+I IL L+ F + + +H
 Sbjct: 276 PMYEQYQIINTHTIVHKNWVDLANAVSYIRFTITYIPFYGILGALL--FLNTIRFLESHW 333

 Query: 268 -----ENEMKFERRITLPPFTEHQIAASRNVA---FHDIFSLLINGGMQYQTEHHFFP 316
 M+ ++ +F Q+ A+ N F+D FS G + +Q EHH FP
 Sbjct: 334 FVWVTQMNHIVMEIDQEA YRDWFS SOLTATC HVEQSFNDWFS-----GHLNFTQIEHLLFP 389

 Query: 317 QIPFYRLPKARVIAEELKKWNLKIHGPI 346
 +P + L K ++ K ++ E P+
 Sbjct: 390 TMRNLHKKIAPLVKSLCAKHGIEYQEKPL 419

Fig. 3E

5 >swiss|Q08871|LLCD SYN3 LINOYL-COA DESATURASE (EC 1.14.99.25)
(DELTA(6)-DESATURASE).//:trnbl|L11421|SSD6DS_1 product: "delta-6 desaturase"; Synecocystis
sp. delta-6 desaturase gene, complete cds. //:trnbl|D90914|SSD914_112 gene: "des6"; product:
"delta-6 desaturase"; Synecocystis sp. PCC6803 complete genome, 16/27, 1991550-2137258.
//:plonly|S35157|S35157 Delta(6)-desaturase - Synecocystis sp.//:gp|D90914|1653589 gene:
"des6"; product: "delta-6 desaturase"; Synecocystis sp. PCC6803 complete genome, 16/27,
1991550-2137258. //:gp|L11421|349563 product: "delta-6 desaturase"; Synecocystis sp. delta-6
10 desaturase gene, complete cds. Length = 359

Score = 43.4 bits (100), Expect = 0.003
Identities = 63/288 (21%), Positives = 101/288 (34%), Gaps = 61/288 (21%)

15 Query: 120 FTLFVTGCLTQKWYSIFLLVLMQIISGWHGSHHNR---NP-ILRKTALVAPLCGGF 175
F L F + + L + + S +GH NNN NP I R + Y + G
Sbjct: 57 FVLFAPIFPVRLGCMVLAIALAAFSFNVGHDANHNAYSSNPHNRVLGNTYDFV--GL 114

20 Query: 176 SNKMWGRKHQ--HMTNTHILKDEDIQHDYKLMQFFL-----FLKWLDSILAS 224
S+ W +HN HH +TN + D +I D + P F W L +
Sbjct: 115 SSFLWRYRHNYLHTYTNILGHDVEIHGCGAVRSPQEHVGIYRQQFYINGLYLFIPF 174

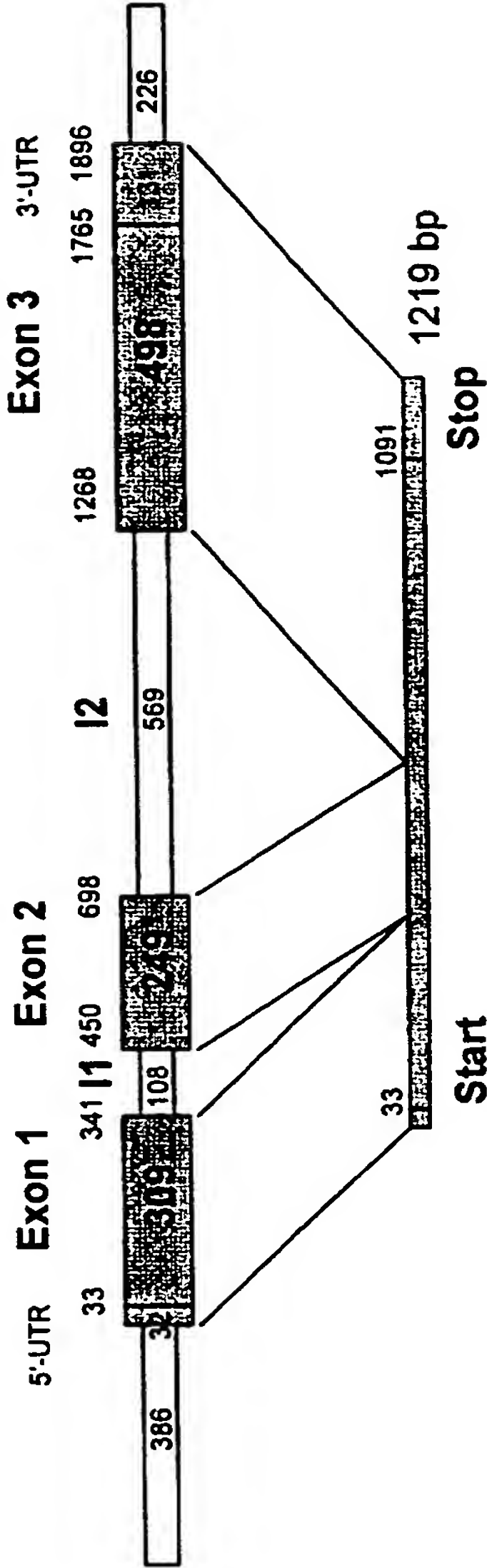
25 Query: 225 YEFEGIFLAL-----HWLLFNQNFYIVLS-----ELIAGFTSASILVG 265
Y+ ++L L H + F +L L GF +L+G
Sbjct: 175 YWFLYDVYLVLNKGYHDEKIPFPQPLELASLLGKLLNLGYVEGLPLALGFSIPEVLIG 234

30 Query: 266 NHENEMKFERRI-TLPFFEH-----QIAASRNYAFHDIFSL 300
M + + T+ H QI + N+A ++ F
Sbjct: 235 ASVTYTYGIVVCTIFMLAHVLESTFLTPDGESGALDDENAICQIRTTANTATHTPTWN 294

Query: 301 LINGGQYQTEHHFFPQIPFYRLPKARVILAEKKWNLKIHGPIFE 348
GG+ +Q HH FP I P+ II + +++ ++ P F+
Sbjct: 295 WTCGLNHQVTHHLFPNICHIHYPQLENIIKDVCOEFGVEYKVPYPTK 342

Fig. 5

Struktur des Δ6-Desaturase Gens



Herstellung des pBDES6 Expressionskonstruktes

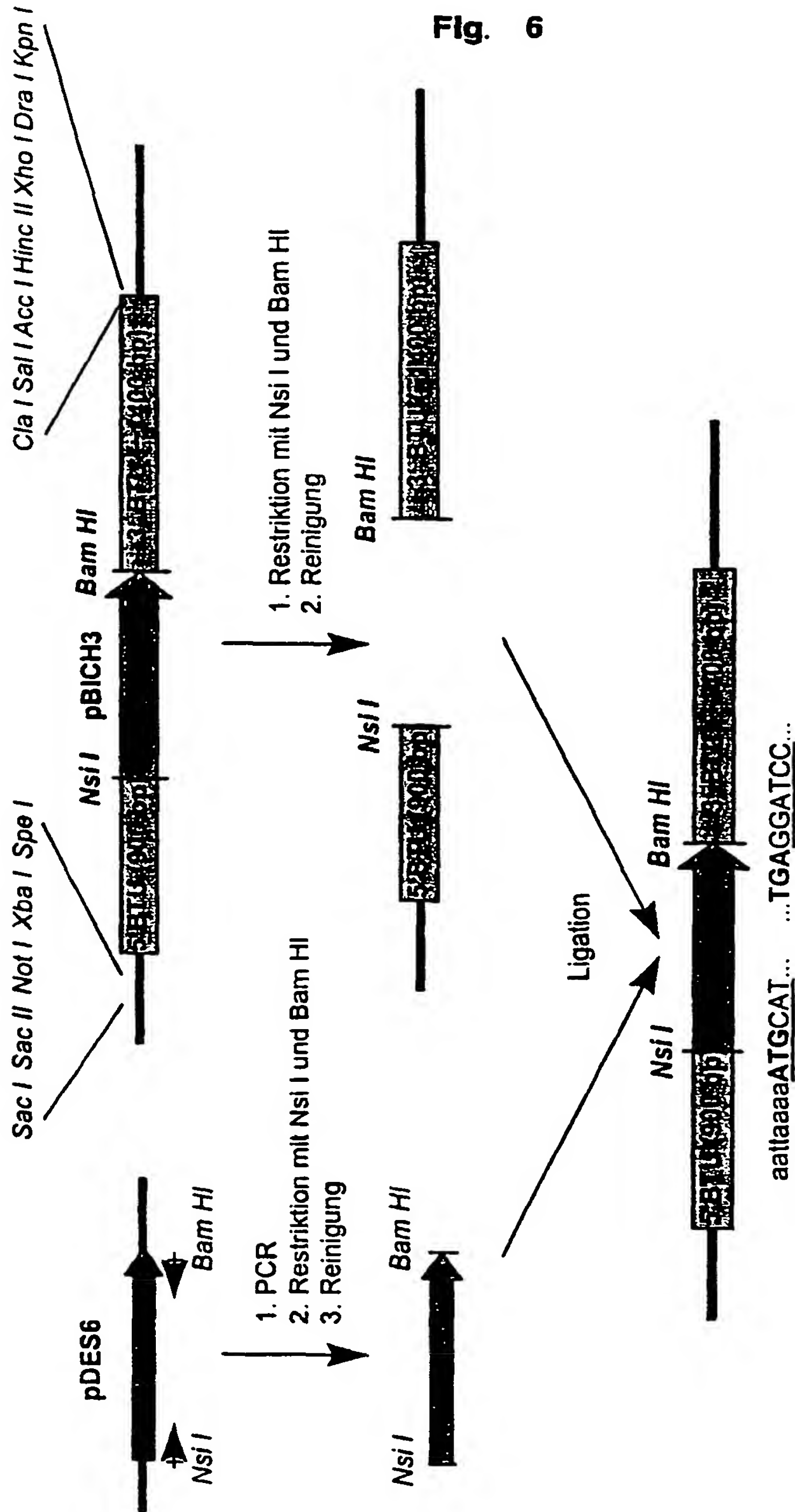
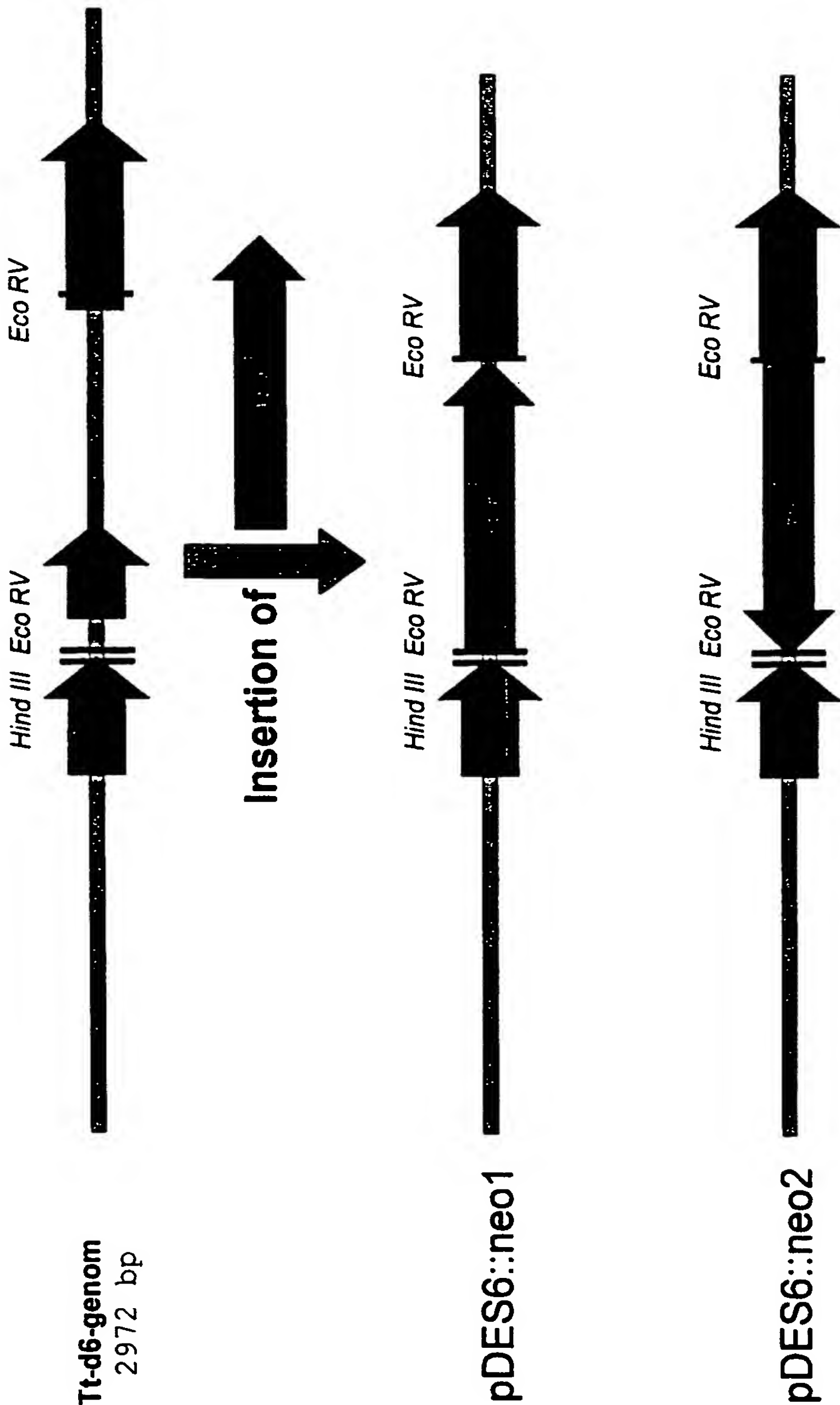


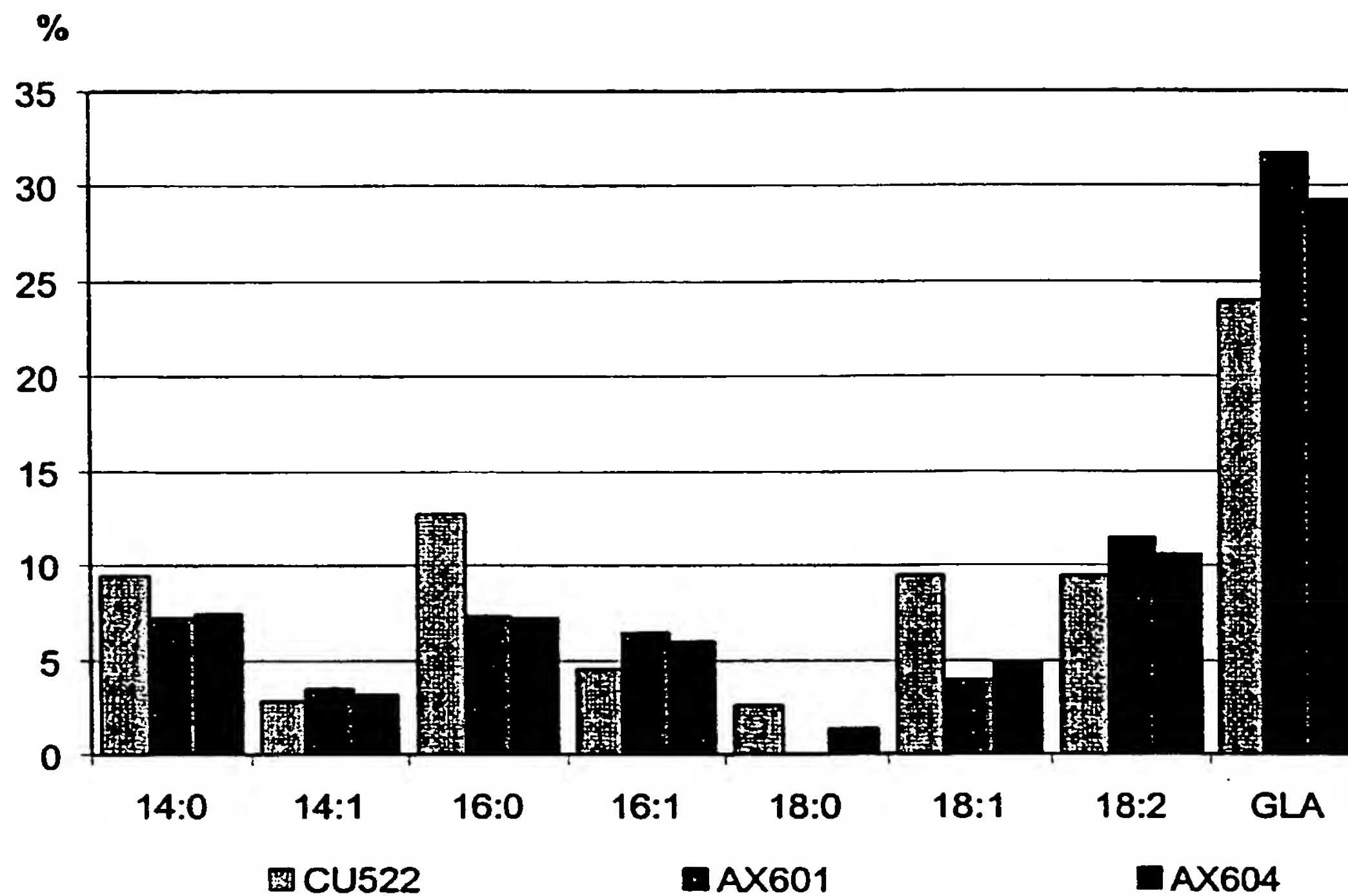
Fig. 7

Delta-6 Desaturase Knock-out Konstrukt



10/10

Fig. 8



Vergleich des Fettsäurespektrums (Hauptfettsäuren) der Tetrahymena pBDES6-Transformanten (AX601 und AX604) im Vergleich zum Tetrahymena-Wildstamm (CU522) nach 50 h Kultivierung. Angegeben ist der prozentuale Anteil der Hauptfettsäuren am gesamt Fettsäurespektrum

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Aventis Research & Technologies GmbH & Co KG

<120> Neue Nukleinsäure aus Tetrahymena kodierend für eine
delta 6-Desaturase, ihre Herstellung und Verwendung

<130> ax99046wo

<140>

<141>

<150> DE 19943270.8

<151> 1999-09-10

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1219

<212> DNA

<213> Tetrahymena thermophila

<400> 1

```
agtaagcaaa ctaaatttaa aaaacaagca ttatgggagt tgataagact taagaagaaa 60
ttgttcttga aaataaacc cgaacttctca acgaatacaa atttatattac aaggataactg 120
aatatgactg cactgaatat gctaaatcaa ataagcatcc tggcgggtctt aatttcctca 180
atttgtttat tgatgagaag taagatttga ctgaatattt cagaacactc cattctaagt 240
aggctttgaa aatttttaaaa tccttcccta agactggcgc aaaataagag gagactgaat 300
cttcaaagag attctcaata tttaaagaaaa agcttaagca tttattcgaa ccaaactggc 360
ctatcgaaat tgggtttattc ttaactacct ttactttatt tgtcactgga tgtttgactc 420
aaaagtggta tttctctatt ccccttcttg tcttaatgca aatcatcagt gggttgattg 480
gtcactctat gaaccacaat cgtaacccta tattaagaaa attcgcttta gtctacgctc 540
ctctttgtgg tgggttctct aataaatggg ggggtaggaa gcacaatcaa catcatatgt 600
tcacaaacaa cattctaaag gacgaagata tctaacacga ttacaaattg tggtaattcc 660
ccttcttatt tttaaagtgg aaattagact ccatcttagc ttcttattat gaatttgaag 720
gaatcttctt tgccttgac tgggtattat tattcaacta aaacttctat atcgtaattc 780
tttctgaatt gattgctggg ttcttcagtg cttctattct tgttggaat catgaaaatg 840
aatgaaatt cgaaagaaga atcactttac catttttcga acatcaaata gctgcaagca 900
gaaactacgc tttccacgac atattctctc tacttattat ggggtggatg taatattaga 960
ctgaacatca ctttttccca taaattcctt tctacagatt acccaaagct cgtgtcataa 1020
ttgctgaaga attaaagaag tggaacctta agattcatga aggacctatt tttgaaaaat 1080
ctcacctttg aaaataaata aatttatatt aaatgcatat tttattagta atactaacia 1140
ttgtaggaaa tgtgttatgg tttgtttact tattactttt taatctgaga aaacagtctt 1200
aacaaaaaaa aaaaaaaaaa                                     1219
```


2/8

<210> 2

<211> 352

<212> PRT

<213> Tetrahymena thermophila

<400> 2

Met Gly Val Asp Lys Thr Gln Glu Glu Ile Val Leu Glu Asn Lys Pro
1 5 10 15

Glu Leu Leu Asn Glu Tyr Lys Phe Ile Tyr Lys Asp Thr Glu Tyr Asp
20 25 30

Cys Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Asn Lys His Pro Gly Gly Leu Asn Phe
35 40 45

Leu Asn Leu Phe Ile Asp Glu Lys Gln Asp Leu Thr Glu Tyr Phe Arg
50 55 60

Thr Leu His Ser Lys Gln Ala Leu Lys Ile Leu Lys Ser Phe Pro Lys
65 70 75 80

Thr Gly Ala Lys Gln Glu Glu Thr Glu Ser Ser Lys Arg Phe Ser Ile
85 90 95

Leu Lys Lys Lys Leu Lys His Leu Phe Glu Pro Asn Trp Pro Ile Glu
100 105 110

Ile Gly Leu Phe Leu Thr Thr Phe Thr Leu Phe Val Thr Gly Cys Leu
115 120 125

Thr Gln Lys Trp Tyr Phe Ser Ile Pro Leu Leu Val Leu Met Gln Ile
130 135 140

Ile Ser Gly Trp Ile Gly His Ser Met Asn His Asn Arg Asn Pro Ile
145 150 155 160

Leu Arg Lys Phe Ala Leu Val Tyr Ala Pro Leu Cys Gly Gly Phe Ser
165 170 175

Asn Lys Trp Trp Gly Arg Lys His Asn Gln His His Met Phe Thr Asn
180 185 190

Asn Ile Leu Lys Asp Glu Asp Ile Gln His Asp Tyr Lys Leu Trp Gln
195 200 205

Phe Pro Phe Leu Phe Leu Lys Trp Lys Leu Asp Ser Ile Leu Ala Ser
210 215 220



.

.

.

.

3/8

Tyr Tyr Glu Phe Glu Gly Ile Phe Leu Ala Leu His Trp Val Leu Leu
225 230 235 240

Phe Asn Gln Asn Phe Tyr Ile Val Ile Leu Ser Glu Leu Ile Ala Gly
245 250 255

Phe Phe Ser Ala Ser Ile Leu Val Gly Asn His Glu Asn Glu Met Lys
260 265 270

Phe Glu Arg Arg Ile Thr Leu Pro Phe Phe Glu His Gln Ile Ala Ala
275 280 285

Ser Arg Asn Tyr Ala Phe His Asp Ile Phe Ser Leu Leu Ile Met Gly
290 295 300

Gly Met Gln Tyr Gln Thr Glu His His Phe Phe Pro Gln Ile Pro Phe
305 310 315 320

Tyr Arg Leu Pro Lys Ala Arg Val Ile Ile Ala Glu Glu Leu Lys Lys
325 330 335

Trp Asn Leu Lys Ile His Glu Gly Pro Ile Phe Glu Lys Ser His Leu
340 345 350

<210> 3

<211> 2492

<212> DNA

<213> Tetrahymena thermophila

<400> 3

taaaacgatt ataaatatca cacaaattaa accgaaaaag agttaaagtg ctaatattaa 60
taatataatt tatctaaatt gaaagatggg tcaattaatt tgaaattatt ttgaagcaaa 120
ataattcgat tcgtgtaaga tggaaattga aagaattaag gtttagaaaa gttctttttg 180
taaaataata gagttaaagt caataaattt tatattacgt aaatcttaaa gtgtgcaaatt 240
gttatcatta acaattctaa atgatgcaaa atattttaaat tattaaaaat aatgatagtt 300
aataaaatca atatttcata ataataataa ggtatctatc tatctatcaa tatttcaata 360
aatattaatt aaaagggttat aaaataagta agcaaactaa atttaaaaaa caagcattat 420
gggagttgat aagacttaag aagaaattgt tcttgaaaat aaacccgaac ttctcaacga 480
atacaaattt atttacaagg atactgaata tgactgcact gaatatgcta aatcaaataa 540
gcatcctggc ggtcttaatt tcctcaattt gtttattgat gagaagtaag atttgactga 600
atatttcaga aactccatt ctaagtaggc tttgaaaatt ttaaaatcct tccctaagac 660
tggcgcaaaa taagaggaga ctgaatcttc aaagagattc tcaatattaa agaaaaagct 720
taagcatgta aatacattca aatgatattt ttattgagca tatttagcat aatttgataa 780
ttttcataag catattttta attataaaaa tgaacatatt tttaaattaa tttagttatt 840



4/8

cgaaccaaac tggcctatcg aaattgggttt attcttaact acctttactt tatttggtcac 900
tggatgtttg actcaaaagt ggtattttctc tattccccctt cttgtcttaa tgcaaatcat 960
cagtgggttg attggtcact ctatgaacca caatcgtaac cctatattaa gaaaattcgc 1020
tttagtctac gctcctcttt gtgggtgggtt ctctaataaa tgggtggggta ggaagcacia 1080
tcaagtaacc ataataatta atataaatat ataaagattt tttgggtttg cgaggaaaaa 1140
agtcatattt tgatgcttta atagtacaaa caatatttga ttgttatgat taaattatta 1200
aagatcttaa tttagccttt tttaaaaatt tcaaataaat ttgaagataa tattattaaa 1260
gtataataaa tgattaagcc aaaatctgta ccaaaaatct gtaaatacaa aatcaacttc 1320
acacaaagat tacacatagc attttatttt ttataataaa ataaatgaaa atagtttttt 1380
attttaagaa atgaaataac tttttttccc tatgattttc aattaataaa aagcattgct 1440
atacaaataa ttgaaaaaag ctaaattcttt tttctattaa aattaattac aaattgtaaa 1500
agattaattt taccatttaa ttaagtacc gcaataagca aatctctatt ttttttaagc 1560
aatgacgtca cggataaata ttatcatact attcctcaat aataaatcat ctttaaaaata 1620
atttaaaact aattaatata attctaataa aagcatcata tggtcacaaa caacattcta 1680
aaggacgaag atatctaaca cgattacaaa ttgtggtaat tccccttctt atttttaaag 1740
tggaaattag actccatctt agcttcttat tatgaatttg aaggaatctt ccttgccttg 1800
cactgggtat tattattcaa ctaaaacttc tatatcgtaa ttctttctga attgattgct 1860
ggtttcttca gtgcttctat tcttggtgga aatcatgaaa atgaaatgaa attcgaaaga 1920
agaatcactt taccattttt cgaacatcaa atagctgcaa gcagaaacta cgctttccac 1980
gacatattct ctctacttat tatgggtggg atgtaattat agactgaaca tcactttttc 2040
ccataaattc ctttctacag attaccctaaa gctcgtgtca taattgctga agaattaaag 2100
aagtggaacc ttaagattca tgaaggacct atttttgaaa aatctcacct ttgaaaataa 2160
ataaatttat tttaaatgca tattttatta gtaatactaa caattgtagg aaatgtgtta 2220
tggtttggtt acttattact ttttaactctg agaaaacagt cttaacattt attcgatttt 2280
atttaacatt acttttttaa aaacaatttt gcttactata aatttacata agtatagtaa 2340
gaaactaagt tgatgggtgtt attttttaat ttttctaatt aatttgatga taaacgatga 2400
tttaatttat taatccagca aataggcata attatattac aaataccagc ccgggccgctc 2460
gaccacgcgt gccctatagt gagtcgtatt ac 2492

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Tetrahymena thermophila

<400> 4

Trp Trp Lys Trp Asn His Asn Ala His His

1

5

10

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> Tetrahymena thermophila

<400> 5

Gly Gly Leu Gln Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro

1

5

10



4

5

6

7

5/8

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 6
tgggtggaart ggamncayaa 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 7
cgdggraana rrtgrtggtc 20

<210> 8
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 8
gaccacgcgt atcgatgtcg actttttttt ttttttttv 40

<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 9
ggaatcacia tcaacatcat atgttcac 28



,

,

,

,

6/8

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 10

cttcgtcctt tagaatgttg tttgtgaac

29

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 11

agtaagcaaa ctaaatttaa aaaacaagc

29

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 12

agtaagcaaa ctaaatttaa aaaacaagc

29

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 13

ggtccttcat gaatcttaag gttccacttc

30



7/8

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 14

cttaagtctt atcaactccc ataatgc

27

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 15

gaagtggaac cttaagattc atgaaggacc

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 16

gcattatgca tgttgataag acttaagaag

30

<210> 17

<211> 35

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 17

tatggatcct caaaggtgag atttttcaaa aatag

35



1

2

3

4

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 18

aaaaataaaa aagtttgaaa aaaaaccttc

30

<210> 19

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

<400> 19

gttttagctga ccgattcagt tc

22



2

7

7

7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/08778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/52 C07K14/44 C12N9/02 C12N1/10 C07K16/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

X	<p>BERTRAM J ET AL: "ISOLATION OF A STEAROYL COENZYME DESATURASE FROM TETRAHYMENA-THERMOPHILA" JOURNAL OF PROTOZOLOGY, vol. 28, no. 1, 1981, pages 127-131, XP002152567 ISSN: 0022-3921 abstract Ergebnisse</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-16
---	--	------

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 December 2000

Date of mailing of the international search report

12.02.01

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Herrmann, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/08778

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOLL M ET AL: "THE EFFECT OF DIETARY STEROL ON THE ACTIVITY OF FATTY ACID DESATURASES ISOLATED FROM TETRAHYMENA-SETOSA" JOURNAL OF PROTOZOLOGY, vol. 37, no. 3, 1990, pages 229-237, XP002152568 ISSN: 0022-3921 the whole document	11
X	--- FUJIWARA Y ET AL: "CYTOPLASMIC LOCATION OF LINOLEOYL-COENZYME DESATURASE IN MICROSOMAL MEMBRANES OF RAT LIVER" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, vol. 233, no. 2, 1984, pages 402-407, XP002152569 ISSN: 0003-9861 das ganze Dokument, speziell Seite 403, "Other methods"	11,13
X	--- NAPIER ET AL: "Identification of a Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase by heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae" BIOCHEMICAL JOURNAL,GB,PORTLAND PRESS, LONDON, vol. 330, no. 2, March 1998 (1998-03), pages 611-614, XP002099453 ISSN: 0264-6021 figure 1.	11
A		1-10, 12-16
X	& DATABASE GENBANK [Online] Accession No. AF031477, 2 May 1998 (1998-05-02) "Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase mRNA, complete cds"	11
A	the whole document	1-10, 12-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08778

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/52 C07K14/44

C12N9/02

C12N1/10

C07K16/20

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>BERTRAM J ET AL: "ISOLATION OF A STEAROYL COENZYME DESATURASE FROM TETRAHYMENA-THERMOPHILA" JOURNAL OF PROTOZOOLOGY, Bd. 28, Nr. 1, 1981, Seiten 127-131, XP002152567 ISSN: 0022-3921 Zusammenfassung Ergebnisse</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-16



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. Dezember 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

12.02.01

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Herrmann, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/08778

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KOLL M ET AL: "THE EFFECT OF DIETARY STEROL ON THE ACTIVITY OF FATTY ACID DESATURASES ISOLATED FROM TETRAHYMENA-SETOSA" JOURNAL OF PROTOZOLOGY, Bd. 37, Nr. 3, 1990, Seiten 229-237, XP002152568 ISSN: 0022-3921 das ganze Dokument	11
X	--- FUJIWARA Y ET AL: "CYTOPLASMIC LOCATION OF LINOLEOYL-COENZYME DESATURASE IN MICROSOMAL MEMBRANES OF RAT LIVER" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, Bd. 233, Nr. 2, 1984, Seiten 402-407, XP002152569 ISSN: 0003-9861 das ganze Dokument, speziell Seite 403, "Other methods"	11,13
X	--- NAPIER ET AL: "Identification of a Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase by heterologous expression in Saccharomyces cerevisiae" BIOCHEMICAL JOURNAL,GB,PORTLAND PRESS, LONDON, Bd. 330, Nr. 2, März 1998 (1998-03), Seiten 611-614, XP002099453 ISSN: 0264-6021	11
A	Abbildung 1	1-10, 12-16
X	& DATABASE GENBANK [Online] Accession No. AF031477, 2. Mai 1998 (1998-05-02) "Caenorhabditis elegans delta6-fatty-acid-desaturase mRNA, complete cds"	11
A	das ganze Dokument	1-10, 12-16

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
10 May 2001 (10.05.01)

International application No.
PCT/EP00/08778

Applicant's or agent's file reference
AX99046WO

International filing date (day/month/year)
08 September 2000 (08.09.00)

Priority date (day/month/year)
10 September 1999 (10.09.99)

Applicant

RÜSING, Matthias et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
03 April 2001 (03.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Zakaria EL KHODARY

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

